

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

***Evaluation der lumbalen Spondylodese mittels
APC-behandelter Titanimplantate***

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lars-Olav Harnisch

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. F. Kandziora
 2. Prof. Dr. med. C. Perka
 3. Prof. Dr. med. T. Mittelmeier

Datum der Promotion: 03.09.2010

Für Mama und Pappa

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	8
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Versuchstiere	15
2.2 Tierversuchsgenehmigung	15
2.3 Implantate	15
2.3.1 Titanoxid Implantat.....	16
2.3.2 Plasma-sprayed-titanium Implantat.....	16
2.3.3 APC-behandeltes Implantat	16
2.4 Versuchsgruppen	18
2.5 Operationstechnik	18
2.5.1 Narkoseeinleitung	18
2.5.2 Operativer Zugang zur Wirbelsäule.....	19
2.5.3 Implantation des Spondylodesecages.....	20
2.5.4 Verschluss des Operationsgebietes.....	21
2.5.5 Narkoseausleitung	22
2.5.6 Postoperativer Zeitraum.....	22
2.6 Euthanasie und Entnahme der Wirbelsäule	22
2.6.1 Euthanasie der Tiere	22
2.6.2 Entnahme der Wirbelsäule	23
2.7 Immunhistologische Untersuchungen	23
2.7.1 Sägen der nativen Wirbelsäulen	23
2.7.2 Aufarbeitung der Präparate	26
2.7.3 Einbetten der Präparate	27

2.7.4	Schneiden der Präparate	28
2.7.5	Färben der Präparate	28
2.7.5.1	Tartrat-resistente saure Phosphatase	28
2.7.5.2	Alpha smooth-muscle actin.....	29
2.7.6	Digitalisierung der Präparate.....	29
2.7.7	Auswerten der Präparate	30
2.7.7.1	Auswertung der Osteoklastenzahl	32
2.7.7.2	Auswertung der Neovaskularisation	33
2.7.7.3	Bestimmung der Referenzflächen	33
2.8	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Operationen.....	36
3.2	Aufarbeitung der Wirbelsäulen	36
3.3	Immunhistologische Untersuchung	37
3.4	Subjektive Einschätzung von Delaminationen.....	38
3.5	Einzelauswertung der untersuchten Parameter	38
3.5.1	Intraindividuelle Varianz der Osteoklastenzahl.....	39
3.5.2	Intraindividuelle Varianz der Knochenfläche	40
3.5.3	Auswertung Osteoklasten pro Knochenfläche.....	40
3.5.4	Intraindividuelle Varianz Anzahl Gefäße	47
3.5.5	Intraindividuelle Varianz der Bindegewebsfläche	47
3.5.6	Auswertung Gefäße pro Bindegewebsfläche	48
4	Diskussion	55
5	Zusammenfassung	62
6	Anhang	63
6.1	Studiencode	63

6.2	Fixierungslösung	64
6.3	Entwässerungsprogramm	65
6.4	Färbeprotokolle	66
6.4.1	TRAP-Färbung (tartrat-resistente saure Phosphatase).....	66
6.4.2	ASMA-Färbung (α -smooth muscle actin)	68
6.5	Tabellen Einzelauswertung der Präparate	71
6.5.1	Bezugsflächen.....	71
6.5.2	Osteoklasten und Gefäße	75
6.6	Kodierungslegende Statistikprogramm.....	79
7	Literaturverzeichnis	80
8	Danksagung	LXXXVI

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin Komplex
AP	acid phosphatase (saure Phosphatase)
APC	anodic plasma chemical
ASMA	alpha-smooth-muscle actin, Alpha glattmuskuläres Aktin
BG	Bindegewebe
CaP	Kalziumphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Komplexbildner mit Kalziumionen)
HA	Hydroxylapatit
HCl	Salzsäure
L1/L2	Bewegungssegment nach Junghanns zwischen den Wirbelkörpern eins und zwei der Lendenwirbelsäule
M.	Musculus
MB	Megabyte
MTLA	Medizinisch-technische Laborassistentin/-assistent
-OH	Hydroxylgruppe
OK	Osteoklasten
PBS	Phosphat buffered saline; Phosphatpufferlösung
plasmatisch/Plasma	Vierter Aggregatzustand, der durch Zufuhr von hohen Energiemengen, meist in Form von Wärme, zu gasförmigen Stoffen entsteht
PS-Ti	plasma-sprayed Titan
ROI	region of interest

Ti-O ₂	Titanoxid
TRAP	tartrat-resistant acid phosphatase (Tartrat-resistente saure Phosphatase)
α-SMA	alpha-smooth-muscle actin

1 Einleitung

Erkrankungen des Bewegungsapparates gehören heute zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen überhaupt. Dabei werden insbesondere Gelenkbeschwerden häufig beklagt, und gerade diese sind mit einer außerordentlich hohen Einschränkung der Lebensqualität verbunden. In Deutschland leiden aktuell ca. 34 Millionen Menschen unter Gelenkbeschwerden (1). Die Möglichkeit der Implantation von Gelenkersatzprothesen hat die Behandlung von Menschen mit Beschwerden dieses Formenkreises revolutioniert. Die entsprechenden Operationen haben in den letzten Jahrzehnten stark an Häufigkeit zugenommen und gehören heute zu den absoluten Routineeingriffen in der Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates (2). So wurden im Jahr 2007 in Deutschland allein 197.000 Hüftgelenksendoprothesen neu implantiert (3).

Seit Beginn der operativen Gelenkersatztherapie wurden sowohl die Operationstechniken ständig perfektioniert, als auch die Materialien kontinuierlich weiterentwickelt. Gleichwohl kann man heute mit den Ergebnissen noch immer nicht restlos zufrieden sein. Denn in bis zu 28 Prozent aller implantierten Endoprothesen kommt es zu einer Lockerung des Materials, bei spinalen Fusionen soll dieser Prozentsatz sogar bis zu 33 Prozent betragen (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13). Diese Lockerungen sind in bis zu 75 Prozent aller Fälle der sogenannten aseptischen Lockerung zuzuordnen (6). Bei dieser Lockerungsart kann weder eine bakteriell hervorgerufene Entzündung, noch ein externer Faktor, wie beispielsweise ein Trauma als Grund für die Lockerung ausgemacht werden (2, 7). Gerade diese unsichere Kausalität ist es, die bis zum heutigen Tage den Einsatz von Implantaten bei Wirbelsäulenerkrankungen problematisch gestaltet. Solange man nicht sicher sein kann, dass eine Dislokation der Implantate durch Lockerung weitgehend auszuschließen ist, überwiegt die Angst vor neurologischen Folgen wie Querschnittslähmungen deutlich den zu erwartenden Nutzen. Die Anwendung von Bandscheibenprothesen ist bisher nur selektionierten Patienten in einigen wenigen Zentren vorbehalten. Um die Anwendung einer breiten Masse zugänglich machen zu können, muss zunächst das Problem der Prothesenlockerung insgesamt und im Besonderen an der Wirbelsäule gelöst werden. Dies ist bis zum heutigen Tage jedoch noch immer nicht befriedigend geschehen.

Bei der Suche nach Lösungsmöglichkeiten fand man einige Prädiktoren auf der Patientenseite, die mit einem schlechteren Einwachsen und einer Lockerung der Prothesen vergesellschaftet sind (1, 7, 14). Diesen Studien zufolge sind neben der primären Diagnose besonders die individuelle Knochenstruktur sowie das Alter des Patienten bedeutsam. Da diese Faktoren aber nur sehr schlecht bis gar nicht beeinflussbar sind, konzentrierte man sich bald auf die Hinterfragung, der für die Prothesenherstellung verwendeten Materialien. Über die vergangenen Jahre hinweg sind verschiedene Werkstoffe für die Herstellung von Implantaten eingesetzt worden, wie zum Beispiel Stahl, Chromlegierungen und Titan, um nur die häufigsten zu nennen (15, 16, 17). Titan hat sich letztendlich aufgrund geradezu idealer Materialeigenschaften für diesen Einsatzbereich etabliert und gilt heute als Material der Wahl für die Prothesenherstellung (18, 19, 20, 21, 22). Gegenüber den anderen verwendeten Materialien ist besonders seine große Festigkeit und hohe Formstabilität in gefertigtem Zustand vorteilhaft. Diese Eigenschaften machen es ideal für den Einsatz in gewichttragenden Körperpartien. Weiterhin ist Titan hypoallergen, sehr korrosionsbeständig und nicht toxisch, es hat ein relativ geringes Gewicht bezogen auf seine Stabilität und eine intrinsische antimikrobielle Wirkung. Nicht zuletzt ist es nicht magnetisierbar, was die Möglichkeit magnetresonanztomographischer Untersuchungen offen lässt, bzw. die Artefakte im Bild im Vergleich zu anderen Werkstoffen deutlich minimieren kann (15, 18, 19, 23). Darüber hinaus gelingt mit Titan als Werkstoff eine bessere Knocheneinheilung als mit den anderen genannten Materialien (15, 18, 22). Doch obwohl Titan heute das Material der Wahl ist und mit ihm deutlich bessere Ergebnisse als mit allen anderen Materialien erzielt werden, bestehen oben genannte hohe Komplikationsraten. Denn Titan ist ein inertes, nicht bioaktives Material, was dazu führt, dass die Osteointegration insgesamt nur mäßig gut gelingt (24).

In den vergangenen fast 30 Jahren sind aus diesem Grund viele und starke Anstrengungen unternommen worden, um diesem Umstand zu begegnen. Dabei stand zunächst die Problemanalyse im Mittelpunkt und damit die Frage, welche Faktoren das Einwachsen des Implantates in den Knochen fördern, und welche diesen Prozess eher gegenteilig beeinflussen. Der Logik und den vorgelegten Forschungsergebnissen folgend gelangte man zu der Erkenntnis, dass das Verhalten eines implantierten Biomaterials auf der Interaktion zwischen dem Material und den lebenden Zellen des Körpers vor Ort beruht. Daher sind neben dem guten Kontakt von Implantat und Ge-

webe vor allem die Oberflächeneigenschaften des Implantatmaterials der entscheidende Faktor für das Einwachsen (16, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32). Es zeigte sich, dass jedes Material mehr oder weniger stark die Ausbildung einer aseptischen Entzündungsreaktion und/oder einer Fremdkörperreaktion bewirkt (5, 18, 33, 34). Diese Reaktionen führen im Extremfall zur frühen Lockerung des Implantates, oder das Implantat wächst schon primär nicht ein (25, 29, 35). Jener Umstand wird noch verstärkt, wenn sich aus dem Metall Partikel lösen und in das umgebende Gewebe eindringen, oder, wenn das Implantat nicht fest genug eingebracht wurde und aufgrund dessen (Mikro-) Bewegungen zwischen Implantat und umgebendem Gewebe stattfinden können (16, 25, 34, 36, 37, 38, 39, 40). Alle diese Vorgänge führen zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus dem Gewebe und konsekutiver Aktivierung entsprechender Abwehrzellen, aber auch von Fibroblasten und Osteoklasten. In der Folge entsteht eine fibro-inflammatorische Zone in unmittelbarer Umgebung des Implantates. Diese Zone verlangsamt oder verhindert das Einwachsen von Knochengewebe und kann sogar zu Osteolysen führen (34, 35, 36, 37, 41, 42, 43, 44, 45). Andererseits kommt es durch die unspezifische Aktivierung von Entzündungszellen zum Verbrauch derselben. Somit ist die fibro-inflammatorische Zone zusätzlich relativ immuninkompetent, was die bakterielle Besiedlung und das Angehen von bakteriellen Entzündungen begünstigen kann (23, 25). Der zumeist gewählte Lösungsansatz dieser Probleme besteht darin, die Oberflächeneigenschaften der Implantate so zu verändern, dass die Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen möglichst gering gehalten werden. Dadurch soll eine ungehinderte Osteointegration möglich werden.

Ein ideales Biomaterial sollte also zusätzlich zu den erforderlichen architektonischen, mechanischen und funktionellen Eigenschaften eine bioaktive Oberfläche haben, deren Eigenschaften so angepasst worden sind, dass sie günstig mit dem entsprechenden Körpermilieu am Implantationsort interagieren können (25, 26, 27, 46, 47).

Ein solches Material ist trotz enormer Forschungsbemühungen derzeit noch nicht verfügbar. Jedoch ist man durch verschiedene Techniken heute in der Lage, die Oberflächeneigenschaften der Implantate zu verändern. Schwartz et al. beschreiben in einer wegweisenden Arbeit zu diesem Thema vier Einflussfaktoren, welche die Zellreaktionen auf das Material beeinflussen (48). Es sind dies die Komposition der verwendeten Materialien, die Oberflächenenergie, die Rauigkeit der Oberfläche und

die Mikrostruktur der Oberfläche. Diesen Prinzipien folgend sind viele Lösungsmöglichkeiten erdacht, Wege beschritten und verschiedene Verfahren entwickelt worden.

Physikalische Bearbeitungen der Oberfläche zielen darauf ab die Interaktion zwischen der Implantatoberfläche und den Proteinen und Körperzellen zu modifizieren. Die bedeutendste Beeinflussung ergibt sich durch die Zusammensetzung der Oberfläche, sowie deren Rauigkeit (21, 49, 50, 51). Man verspricht sich von diesen Modifikationen eine Vergrößerung der Oberfläche und dadurch bessere Adhäsionsmöglichkeit für Osteoblasten und Proteine. Auf diese Weise soll das Einwachsen des Implantates gefördert und die Bildung einer fibrösen Schicht verhindert werden (26). Besonders beachtlich und daher hier beispielhaft erwähnt, scheint die Bearbeitung der Oberfläche mit dem Plasma-spray-Verfahren zu sein. Durch die Kombination unterschiedlicher Materialien und die Variation diverser Herstellungsparameter ist man mit diesem Verfahren in der Lage eine Oberfläche gewünschter Rauigkeit zu produzieren (21, 52). Auf diese Weise bearbeitete Implantate konnten jedoch den theoretischen Vorteil in der Praxis nicht bestätigen. Die vorgelegten Studiendaten sind äußerst heterogen (14, 27, 28, 30, 49, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59). Unzweifelhaft ist hingegen, dass es der neu aufgetragenen Oberfläche an mechanischer Stabilität mangelt; eine verstärkte Lösung von Partikeln bis hin zu größeren Teilen der Oberflächenbeschichtung wurde mehrfach beschrieben (12, 15, 30, 52, 56, 60, 61, 62, 63).

Chemische Modifikationen haben einen hohen Stellenwert bei der Anpassung von Oberflächen, besonders aufgrund vielversprechender theoretischer Überlegungen. So kann man den speziellen Bedürfnissen unterschiedlicher Gewebe entsprechende Modifikationen vornehmen. Durch chemische Methoden wird die äußere Gestalt der Werkstücke an sich nicht verändert. Es werden Behandlungen mit Säuren und Laugen durchgeführt und elektrochemische Verfahren angewendet. Besonders vielversprechend sind biochemische Behandlungen. Sie bieten die Möglichkeit die komplexen biochemischen Phänomene, die an der Kontaktfläche stattfinden zu kontrollieren, in gewünschte Bahnen zu lenken und somit direkt Einfluss auf die Osteointegration zu nehmen. Es wurden Versuche mit vielen Proteinen, Molekülen und chemotaktischen Faktoren unternommen, die auf unterschiedliche Arten an und auf der Oberfläche immobilisiert wurden (26, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70). Jedoch konnten auch diese Versuche keine überragend guten Ergebnisse erbringen.

Besonders zielführend erscheint es die Oberfläche möglichst knochenähnlich zu gestalten. Dafür spricht, dass eine gewisse Konzentration von Kalzium und Phosphat für die Initiation der Knochenbildung nötig zu sein scheint (71). Ganz und gar aus Kalziumphosphat hergestellte Keramikimplantate haben jedoch sehr schlechte mechanische Eigenschaften. Sie eignen sich nicht als Implantat, insbesondere nicht für den Einsatz in Körperregionen, bei dem vom Implantat Gewicht aufgenommen und getragen werden muss (72). Aus diesem Grunde wurde versucht die Oberfläche von Metallimplantaten mit Kalziumphosphat/Hydroxylapatit zu maskieren und auf diese Weise ein Mimikri zu erzeugen. Diese Versuche haben gemeinsam, dass es durch die derzeit routinemäßig angewendeten Verfahren nicht möglich ist eine kontrollierte Freisetzung der Moleküle zu erreichen (34, 73, 74). Daher kommt es zu unphysiologisch hohen Ionenkonzentrationen und unvorteilhaften pH-Wert Verschiebungen in der unmittelbaren Umgebung der Implantate (28, 75). Darüber hinaus besteht auch bei diesem Verfahren das bereits zuvor erwähnte Problem der schlechten mechanischen Stabilität.

Parallel zu dem Ansatz der Verwendung von isolierten Techniken wurde versucht durch Kombination verschiedener Verfahren, besonders von physikalischen und chemischen Modifikationen, deren Auswirkungen zu potenzieren (26, 76). So kann man zum Beispiel mit dem Plasma-sprayed-Verfahren neben metallischen Partikeln zusätzlich Hydroxylapatit-Kristalle auf die Oberfläche aufsprühen. Auf diese Weise erschafft man eine physikalisch raue Oberfläche mit knochenähnlich-bioaktiven Merkmalen. Dieser und viele andere Kombinationsversuche führten zwar zu einer Verbesserung der Eigenschaften, konnten jedoch keinen absoluten Durchbruch offenbaren (15, 76).

Eines der neuesten Verfahren zur Modifikation einer Titanoberfläche und deren bioaktiver Gestaltung wurde von Frauchiger et al. (24) beschrieben. Es handelt sich dabei um das sogenannte Anodic-plasma-chemical-Verfahren. Dieses Verfahren beruht auf elektro-biochemischen Prozeduren: Durch die dielektrische Auflösung einer Titanoxidschicht an einer metallischen Anode, die sich in Kontakt mit entsprechenden Elektrolyten befindet, ist es möglich Kalziumphosphat in eine Titanoxid-Matrix zu inkorporieren. Damit werden die Vorteile einer hohen Oberflächenfestigkeit mit einer maximal knochenähnlich-bioaktiven Oberfläche kombiniert (77). Darüber hinaus ist es möglich durch spezifische Variationen der APC-Schicht eine weitgehend kontrol-

lierte Freisetzung der Moleküle aus dieser Schicht zu erreichen. Dieses Verfahren könnte die bisherigen Probleme bei der Implantation von Biomaterialien lösen und die Osteointegration von Implantaten deutlich verbessern. Ein weiterer heutzutage nicht zu unterschätzender vorteilhafter Faktor dieses Verfahrens ist das schnelle und besonders preisgünstige Herstellungsverfahren.

In bereits durchgeführten Versuchen konnte eine sehr gute Zytokompatibilität gezeigt werden, weitaus besser, als bei unbehandeltem Titan und ebenfalls als bei auf der Oberfläche deponiertem Hydroxylapatit (60, 78, 79).

Nach diesen bereits erfolgreich durchgeführten Versuchen ist es notwendig die ermutigenden Ergebnisse des Zellkulturversuches im Lebendmodell-Versuch zu kontrollieren. Denn es ist allgemein akzeptiert, dass in-vitro Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die in-vivo Situation zu übertragen sind, da bei letzterer naturgemäß keine kontrollierten Bedingungen herrschen. Im Gegenteil sind bei der in-vivo Testung eine Vielzahl von Mechanismen letztlich am Endergebnis beteiligt. Ein bereits in unbelasteter Umgebung durchgeführter in-vivo Versuch zeigte ebenfalls vielversprechende Ergebnisse des neuen Verfahrens (80). Um die Aussage dieser Studie bezüglich der Qualität und der möglichen Einsatzbereiche zu erweitern soll nun die Belastung in weitere Versuche integriert werden. Darüber hinaus scheint es notwendig sich der Wirbelsäule als Gelenkersatzregion zu widmen, da in diesem Bereich bisher gerade für junge Patient eine echte Alternative zur Versteifungsoperation fehlt. Die Zurückhaltung aufgrund der Lockerungsproblematik könnte mit dem APC behandelten Material möglicherweise überwunden werden. Zur in-vivo Untersuchung unter Belastung bietet sich ein gut evaluiertes Tiermodell der Wirbelsäule mit bekanntermaßen guter Übertragbarkeit auf den Menschen an (80, 81, 82, 83, 84, 85, 86). Um nicht zu viele Faktoren gleichzeitig einzubeziehen erscheint es sinnvoll zunächst die Materialeigenschaften isoliert zu testen und erst in der Folge die eigentliche gelenkige Prothese als Faktor in folgende Studien aufzunehmen.

Bei der vorliegenden Studie wurde in einem Schafmodell mittels Versteifung von Bewegungssegmenten der Lendenwirbelsäule die Zytokompatibilität verschiedener Materialien unter Belastung in-vivo getestet. Die vorliegende Arbeit beschreibt die immunhistologischen Untersuchungen an der Implantat-Knochen-Grenzfläche eines mit APC behandelten Implantats im intervertebralen Spodylodesemodell am Schaf. Dies

erfolgt im Kontext eines Gesamtprojektes, bei dem neben den immunhistologischen Untersuchungen ebenfalls konventionell histologische sowie radiologische und biomechanische Untersuchungen durchgeführt wurden. Diese werden an anderer Stelle beschrieben. Durch histologische Untersuchungen des unmittelbar angrenzenden Gewebes mit spezifischen Färbungen war eine Objektivierung der dort stattfindenden Interaktionen möglich. Zur Charakterisierung von aseptischen Entzündungsreaktionen und Osteolysen erscheint es naheliegend Neovaskularisation und Osteoklasten als Marker zu verwenden (33, 44, 45, 87, 88).

Der vorliegenden Arbeit liegt folgende Hypothese zugrunde:

Die Implantate, die mit dem APC-Verfahren modifiziert wurden, werden weniger Osteolysen und weniger Entzündungsreaktionen, quantifiziert durch Osteoklasten und Neovaskularisation, zeigen. Dieser Unterschied wird zum Zeitpunkt 6 Wochen deutlicher sein als zum Zeitpunkt 12 Wochen post operationem.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere der vorliegenden Studie waren Schafe der Rasse Merino-Mix. Insgesamt waren 39 Schafe an dieser Untersuchung beteiligt. Die Tiere waren alle älter als 2 Jahre, ausschließlich weiblich und bei Einschluss in die Studie gesund. Alle Tiere wurden vor Einschluss in die Studie von Tierärzten auf Krankheiten und Trächtigkeit untersucht.

2.2 Tierversuchsgenehmigung

Die Zustimmung der Tierschutzkommission des Landes Berlin lag vor Studienbeginn unter der Genehmigungsnummer G0228/06 vor. Die Pflege der Versuchstiere sowie operativer, peri- und postoperativer Umgang mit ihnen orientierte sich an den zu diesem Zeitpunkt geltenden Tierschutzbestimmungen. Die Betreuung wurde von qualifizierten Tierpflegekräften mit langjähriger Erfahrung im Umgang mit Versuchstieren und den Veterinärmedizinerinnen des Forschungsteams übernommen.

2.3 Implantate

Die Evaluation der mit dem APC-Verfahren behandelten Titanoberflächen wurde in dem vorliegenden Projekt mittels intervertebraler Spondylodesecages durchgeführt. Die Cages standen in zwei verschiedenen Größen, 6 mm und 8 mm Höhe, zur Verfügung. Die Entscheidung für die jeweilige Höhe des zu implantierenden Cages wurde individuell bei Betrachtung des Operationssitus nach Präparation des entsprechenden lumbalen Wirbelsäulenabschnittes vom Operateur getroffen.

Alle in dieser Untersuchung verwendeten Titanimplantate stammten sämtlich von der Fa. Synthes, Schweiz (siehe Abbildung 1). Die Implantate und Setzinstrumente wurden eigens für diesen Versuch entwickelt und hergestellt.

Es folgt eine detailliertere Beschreibung der verschiedenen Implantate mit besonderer Beachtung der Unterschiede bei den Herstellungsverfahren.

2.3.1 Titanoxid Implantat

Bei diesen Implantaten handelt es sich um ein speziell weiter behandeltes Titan-Werkstück, auf dessen Oberfläche sich eine Oxidschicht gebildet hat. Die Titanoxidschicht entsteht durch Abscheidung von Titanoxidsalzen auf der Oberfläche. Dazu werden die Implantate in eine wässrige, stark saure Titansalzlösung gegeben, in der zunächst die Oxidschicht gelöst wird. Der Abscheidvorgang einer neuerlichen Titanoxidschicht geschieht spontan, jedoch geordnet. Die Dicke der Oxidschicht lässt sich durch zeitliche Variation des Vorganges beeinflussen. Je nach Dicke der Oxidschicht entsteht durch Interferenz eine unterschiedliche Färbung der Oberfläche. In vorliegendem Fall hat die Oxidschicht eine Dicke von 150-200 nm, die Interferenzfarbe dieser Dicke ist gelblich-golden.

2.3.2 Plasma-sprayed-titanium Implantat

Bei diesem Verfahren wird Titanpulver mit einer sehr hohen Geschwindigkeit durch eine extrem heiße Flamme (5000-15000° C) auf eine Titanoberfläche gesprüht. Durch die extreme Hitze der Flamme wird der Metallpulver plasmatisiert. Bei Auftreffen des plasmatisierten Puders auf die metallische Oberfläche erstarrt das Titanplasma aufgrund des Temperaturunterschiedes auf der Oberfläche. Das Ergebnis ist ein bizarrer, unregelmäßig geformter dünner (200-300 µm) Oberflächenüberzug aus Titan. Mit diesem Verfahren erreicht man neben der sehr komplexen Oberflächenstruktur eine starke Oberflächenvergrößerung (28).

2.3.3 APC-behandeltes Implantat

Für die Behandlung mit dem APC-Prozess (anodic-plasma-chemical) wird ein Titanimplantat benötigt, auf dessen Oberfläche sich eine Oxidschicht gebildet hat. Die Bildung dieser Oxidschicht geschieht spontan durch chemische Reaktion mit Luftsauerstoff. Das Implantat wird dann in eine Kalzium und ionisiertes Phosphat enthaltende Lösung gegeben. Durch Zugabe von EDTA wird das Kalzium komplexiert, was dessen Löslichkeit während der Verarbeitung erhöht. Der pH-Wert der Lösung wird durch Titrierung mit Phosphorsäure und Bikarbonat auf pH 14 eingestellt, die Temperatur der Lösung beträgt 25°C bzw. 75°C.

Durch punktuelle Applikation von dielektrischem Strom (200 mA bzw. 290 mA) wird ein Zusammenbruch des Oxidfilms auf der Oberfläche des Titanmaterials herbeige-

führt. Durch die bei diesem Prozess der Anodisation entstehende Hitze wird das Titan punktuell für den Bruchteil einer Sekunde zu Plasma. In diesem Moment wird das Metall zur Anode, der Kalzium-EDTA-Komplex und die Phosphationen wirken als Kathode. Aufgrund der Ladungen wird Kalziumphosphat (CaP) gebildet, was sich an das positiv geladene Titan anlagert. Das kurzzeitig plasmatisch gewordene Titan erstarrt nach Beendigung der Energiezufuhr wieder, jedoch zusammen mit den daran gebundenen CaP-Kristallen. Auf diese Weise werden die Kalziumphosphat-Kristalle in die Titanoxidschicht inkorporiert. Es entsteht so eine 2 µm starke biometallische Oberflächenschicht. Die Stärke der Schicht kann durch Wiederholung des Vorganges erhöht werden (24). Aufgrund der Inkorporation des Kalziumphosphats in die Oberflächenschicht ist die Oberfläche dieser Präparate makroskopisch wie mikroskopisch glatt (siehe Abbildung 1 & 2 jeweils rechts).



Abbildung 1: Verwendete Implantate
links: Titanoxid
mittig: plasma sprayed titanium
rechts: anodic plasma chemical (APC)

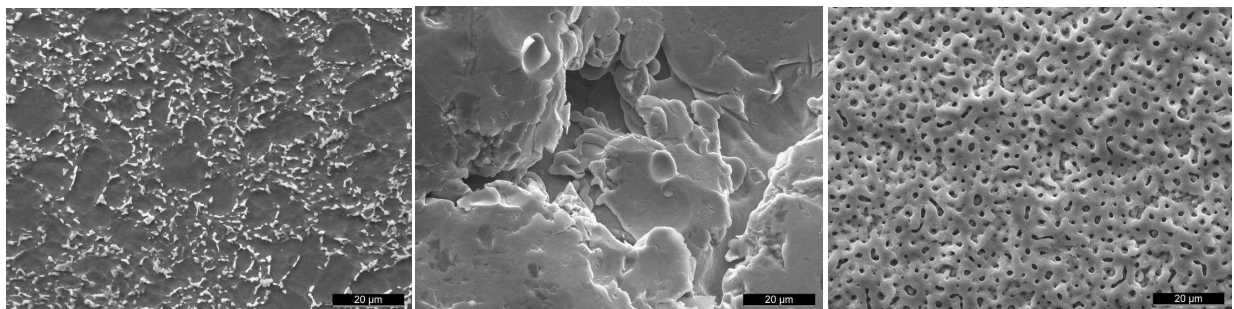


Abbildung 2: Oberflächenstrukturen der verwendeten Implantate
links: Titanoxid
mittig: plasma sprayed titanium
rechts: anodic plasma chemical (APC)

2.4 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden in insgesamt sechs unterschiedliche Gruppen randomisiert. Die Zuordnung der Implantate zu den Versuchstieren wurde vor Beginn der klinischen Phase vom Studienleiter ohne vorherige Kenntnis der Tiere vorgenommen. Um einen etwaigen Effekt der Operationserfahrung auf das Ergebnis auszuschließen wurde die Reihenfolge der Implantate variabel gewählt. Die Tiere mit zwölf Wochen Standzeit wurden aus organisatorischen Überlegungen zuerst operiert.

Die Gruppen setzten sich wie folgt zusammen:

Jeweils zwei Gruppen erhielten identische Implantate. Es gab also zwei Gruppen mit Titanoxid-Implantaten, zwei Gruppen mit Plasma-sprayed-Titanimplantaten und zwei Gruppen mit nach dem APC-Verfahren behandelten Titanimplantaten. Von diesen Gruppen trugen drei die Implantate sechs Wochen, die jeweils anderen drei Gruppen trugen die Implantate zwölf Wochen. Pro Tier wurden zwei Bewegungssegmente der Wirbelsäule mit den jeweils identischen Implantaten versorgt.

2.5 Operationstechnik

Als operativer Zugang zur lumbalen Wirbelsäule zwecks Implantation der Spondylo-
desecages wurde ein links-retroperitonealer Zugang gewählt. Die Operationstechnik ist angelehnt an das Vorgehen, wie es von Baramki et al. beschrieben worden ist (89). Eine sehr ähnliche Operationstechnik wurde von Tay et al. für die lumbale inter-
vertebrale Spondylodese des Menschen und Zou et al. für ein anderes Tiermodell beschrieben (90, 39). Der Ablauf der gesamten Operation ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

2.5.1 Narkoseeinleitung

Vor der Operation unterlagen die Tiere einer eintägigen Nahrungskarenz. Über einen peripheren venösen Zugang wurde das Schaf mit einer körpergewichtsadaptierten Menge Thiopental (Trapanal®; Fa. Nycomed, Österreich) sediert. Nach Kontrolle des Fehlens von Abwehrreflexen erfolgte die endotracheale Intubation mit einem Tubus der Stärke 8,5 und die maschinelle Beatmung (Beatmungsgerät „Sulla“; Fa. Dräger, Deutschland). Die Narkose wurde durch ein Gemisch aus Isofluran und Sauerstoff-Lachgas aufrechterhalten. Als Analgetikum wurde Fentanyl verwendet (Fa. Janssen-

Cilag, Belgien). Es wurden vor der Intubation eine in der Veterinärmedizin übliche Intubationsdosis des Opioids, im weiteren Verlauf entsprechende Boli alle 30 Minuten jeweils intravenös appliziert. Weiterhin wurde eine Pansensonde zur Entgasung gelegt. Die Überwachung der Vitalparameter umfasste eine 3-Punkt EKG-Ableitung, eine nichtinvasive oszillometrische Blutdruckmessung sowie die spektralphotometrische Messung der Sauerstoffsättigung mittels Ohrclip (alle Geräte Fa. Siemens, Deutschland). Eine eventuell notwendige Volumensubstitution erfolgte anhand klinischer Parameter mit Vollelektrolytlösung (Sterofundin®; Fa. Braun, Deutschland). Zur antibiotischen Abschirmung wurden zu Beginn der Operation einmalig 3 g eines Kombinationspräparates aus Ampicillin und Sulbactam (Unacid®; Fa. Pfizer, Deutschland) intravenös als Kurzinfusion verabreicht. Das Schaf wurde dann in Rechtsseitenlage auf dem Operationstisch gelagert und durch Haltegurte fixiert. Die Wolle wurde im Bereich des operativen Zugangs geschoren. Es schloss sich eine intensive Hautdesinfektion an, alle restlichen Bereiche wurden steril abgedeckt.

2.5.2 Operativer Zugang zur Wirbelsäule

Zunächst erfolgte die Kippung des Operationstisches um ca. 30° nach dorsal, um das Schaf in eine modifizierte Seitenlage zu bringen und damit den operativen Zugang zu erleichtern. Nach palpatorischer Orientierung erfolgte die diagonale Hautinzision, diese wurde von 2 cm kaudal des kostovertebralen Winkels nach ventrokaudal bis 5 cm vor die laterale Oberschenkefalte geführt. Die subkutane Fettschicht wurde mit dem elektrischen Kautermesser durchschnitten und der M. obliquus externus dargestellt. Nun wurde über den peripheren Venenzugang ein Muskelrelaxanz (Pancuronium; Fa. Essex Pharma, Deutschland) in einer zur Relaxierung von Schafen üblichen Dosierung appliziert. Der M. obliquus externus wurde in Faserrichtung eröffnet, mit der Hand stumpf zur Seite gedrängt und damit der M. obliquus internus frei gelegt. Eine etwaige weitere Fettschicht auf dem inneren schrägen Bauchmuskel wurde wiederum mit dem Kautermesser durchtrennt. Auch die Inzision des M. obliquus internus erfolgte in Faserrichtung. Direkt nach stumpfem beiseite drängen dieses Muskels wurde darunter der M. transversus abdominis sichtbar. Auch dieser Muskel wurde mit der Schere in Faserrichtung eröffnet, wobei hier besonders vorsichtig vorgegangen werden musste, um das direkt darunter liegende und teilweise mit dem Muskel verwachsene Peritoneum nicht zu verletzen. Nach Eröffnung des queren Bauchmuskels wurde das Peritoneum stumpf mit der Hand von diesem Mus-

kel gelöst, immer unter Beachtung der Integrität des Bauchfells. Die Abtrennung des Peritoneums vom M. transversus abdominis in dorsaler Richtung eröffnete den Zugang zum Retroperitonealraum. Die Baueingeweide und das Peritoneum wurden mittels Leberhaken zurück gehalten und die beiden Muskeln M. quadratus lumborum und M. psoas major identifiziert. Man gelangte nun durch stumpfe Präparation unter Schonung der hierbei exponierten Segmentgefäße zwischen diesen beiden Muskeln hindurch auf die Wirbelsäule.

2.5.3 Implantation des Spondylodesecages

Die Identifikation des Segmentes L1/L2 erfolgte palpatorisch im Operationssitus. In die palpatorisch identifizierte Bandscheibe des Segmentes L1/L2 wurde ein Kirschner-Draht eingebracht und unter dem Röntgen-Bildwandler die Korrektheit des identifizierten Segmentes überprüft.

Es wurde nun ein SynFrame[®] (Fa. Synthes, Schweiz) an den Operationstisch angebracht und mit Haken versehen. Mit diesen Haken wurde das Peritoneum samt Inhalt zurück gehalten. Dann wurde ventral und dorsal der Wirbelsäule jeweils ein breiter Haken nach Hohmann eingebracht und damit ventral der M. quadratus lumborum und dorsal der M. psoas major aus dem Operationsfeld gedrängt. Der ventrale Haken wurde mit der Spitze auf der gegenüberliegenden Seite der Wirbelsäule verhakt und während der weiteren Operation von einem Assistenten gegen das Herausrutschen gesichert. Der dorsale Haken wurde mit der Spitze im Foramen vertebrale verankert und durch Konnektion mit dem SynFrame[®] dort fixiert. An der nun ungehindert einsehbaren Wirbelsäule wurden die Muskelansätze der paravertebralen autochthonen Rückenmuskulatur zunächst mit dem elektrischen Kautermesser von den Wirbelkörpern abgetrennt. Hierzu war unter Umständen eine erneute Muskelrelaxation nötig. Die zuvor gelösten Muskelansätze wurden nun noch mit einem breiten Meißel von der Bandscheibe gedrängt. Folgend wurde die Bandscheibe mit einem langen Skalpell und einer Klinge Nr. 11 kranial und kaudal direkt am Übergang zur Deck- bzw. Bodenplatte des angrenzenden Wirbelkörpers inzidiert. Für die Entfernung der Bandscheibe wurde zunächst ein Luer verwendet. Wurde der Zwischenwirbelbereich zu eng für den Einsatz dieses Werkzeuges wurde die Ausräumung mittels Rongeur fortgesetzt bis das Bandscheibengewebe vollständig entfernt war. Anschließend wurden die Knorpelschichten von Grund- und Deckplatte der angrenzenden Wirbelkörper mit

verschiedenen Küretten entfernt (alle Geräte Fa. Karl Storz, Deutschland). Waren die Knorpelplatten vollständig entfernt, wurde mit einem speziellen Probecage geprüft, ob der Bandscheibenraum weit genug war den Cage aufzunehmen. War dies nicht der Fall wurde er durch erneuten Einsatz der Küretten und im Ausnahmefall zusätzlich durch Meißel und Hammer erweitert, bis genügend Platz zum Einbringen des Titanimplantates in press-fit-Technik geschaffen war.

Zur Implantation des Spondylodesecages wurde dieser in einen speziellen Applikator eingespannt und durch gezielte Hammerschläge von ventrolateral in den Zwischenwirbelraum eingebracht. Der korrekte Sitz ist definiert als symmetrisch median in der Frontalebene sowie sagittal 1-2 mm dorsal des Wirbelkörpervorderrandes. Das vorliegende Ergebnis wurde diesbezüglich palpatorisch und makroskopisch im Operationssitus und mittels Durchleuchtung unter dem Röntgen-Bildwandler in zwei Ebenen (ventro-dorsal und seitlich) kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. War der Sitz korrekt wurde dies durch eine Momentaufnahme des Bildwandlers dokumentiert.

Es folgte die palpatorische Identifikation des zweiten zu operierenden Segmentes L3/L4 mit der verbindenden Bandscheibe. Die weitere Prozedur wurde exakt wie beim ersten Segment beschrieben durchgeführt. Nach Bilddokumentation des Sitzes beider Spondylodesecages in einer Aufnahme war die Implantation beendet.

2.5.4 Verschluss des Operationsgebietes

Der Wundverschluss erfolgte in 3 Schichten. Zunächst wurde der M. transversus abdominis, dann der M. obliquus internus durch fortlaufende Nähte mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Bei kleineren Tieren mussten diese beiden Muskeln aufgrund ihrer dünnen Struktur gegebenenfalls in einer gemeinsamen Schicht vernäht werden. Danach erfolgte die Naht des M. obliquus externus mit dem gleichen Nahtmaterial. Sofern möglich, weil technisch machbar, wurde die Faszie mit einzelnen Sicherungsnähten versehen. Die Subkutannaht erfolgte mit Einzelheftnähten. Schließlich wurde die Hautdecke ebenfalls mit Einzelheftnähten verschlossen. Hierfür wurde ein nicht resorbierbares Nahtmaterial verwendet. Auf einen Wundverband wurde aufgrund des Felles verzichtet, anstelle dessen wurde die Wunde mit Sprühpflaster geschützt.

2.5.5 Narkoseausleitung

Vor Ende der Narkose und Beendigung der Schmerzmedikation erhielt das Tier ein Opiatpflaster (Durogesic[®], Wirkstoff Fentanyl; Fa. Janssen-Cilag, Belgien). Der Aufwachvorgang geschah unter kontinuierlicher Kontrolle der Vitalparameter. Die Extubation erfolgte bei stabiler Spontanatmung, intensiven Kaubewegungen und Bewegungen der Extremitäten. Nach Transfer in den Stall erfolgte dort die Lagerung in Bauchlage. Das Schaf wurde bis zum Aufstehen und der ersten Nahrungsaufnahme weiterhin intensiv überwacht.

2.5.6 Postoperativer Zeitraum

Direkt nach der Operation wurden die Tiere in den Stallungen der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité gehalten. Die Inspektion der Wunde erfolgte täglich durch Tierärzte, zusammen mit einer Temperatur- und Gewichtskontrolle und der Beurteilung des Allgemeinzustandes des Tieres. Alle Befunde wurden genau im Stallbuch notiert. Das Ziehen der Fäden erfolgte am 14. postoperativen Tag. Nach dem Fadenzug wurden die Tiere in die Freilandhaltung gegeben, auch hier fanden weiterhin häufige Kontrollen des Zustandes der Tiere durch Tierärzte statt. In festgelegten Abständen von sechs und zwölf Wochen post operationem wurden Röntgenaufnahmen der lumbalen Wirbelsäule angefertigt.

2.6 Euthanasie und Entnahme der Wirbelsäule

Nach der zuvor festgelegten Standzeit mit implantierten Spondylodesecages wurden die Versuchstiere nach folgendem Protokoll unter Beachtung der zu diesem Zeitpunkt geltenden Tierschutzbestimmungen euthanasiert.

2.6.1 Euthanasie der Tiere

Zunächst erfolgte die Lagerung des betroffenen Tieres in Seitenlage. Das Schaf erhielt einen peripheren venösen Zugang, durch den Thiopental (Trapanal[®]; Fa. Nycomed, Österreich) appliziert wurde. Die Injektion erfolgte zur Vermeidung von Exzitationen zügig bis zum Eintreten eines klinischen Atemstillstandes. Anschließend wurden über denselben peripheren Venenzugang 50 ml 7,5% Kalium-Chlorid-Lösung injiziert. Hieraus resultierte wenige Sekunden nach Injektion der Tod durch Asystolie, der auskultatorisch von zwei beteiligten Medizinern festgestellt wurde.

2.6.2 Entnahme der Wirbelsäule

Nach Lagerung des Leichnams in Bauchlage wurde die Haut über der Wirbelsäule mittels Skalpell vom unteren Rippenbogen bis zum Beckenkamm abgelöst und die Muskulatur freigelegt. Nach Lösung der Muskulatur und Absetzen der Wirbelsäule mit einer Handsäge großzügig kranial und kaudal der versteiften Wirbelsäulensegmente erfolgte die Entnahme der Wirbelsäule mitsamt der autochthonen Rückenmuskulatur en bloc. Nach einer abschließenden Röntgenaufnahme im anterior-posterioren und lateralen Strahlengang und einer CT-Untersuchung der entnommenen Wirbelsäule wurden die beiden Segmente mittels der Handsäge voneinander getrennt. Es wurden grob die noch vorhandenen Gewebereste (Muskulatur, Sehnen, Bindegewebe) entfernt. Die frischen Wirbelsäulensegmente wurden dann an den Enden in Kunststoff eingebettet und den biomechanischen Testungen unterzogen. (Die biomechanischen Untersuchungen wurden von einem weiteren Mitglied des Forschungsteams durchgeführt und sind an anderer Stelle beschrieben.)

2.7 Immunhistologische Untersuchungen

Nach Abschluss der biomechanischen Untersuchungen wurden die an den kranialen und kaudalen Enden mit Plastikbettung versehenen Segmente bis zum Sägen in Fixationslösung gelagert (für Details siehe Anhang; 6.2). Nach dem Sägevorgang folgten Fixierung, Entfernung des Implantates, Entkalkung des Präparates, Entwässerung der Proben, Einbettung in Paraffin, Schneiden mit dem Mikrotom, Färbung der Präparate und mikroskopische Auswertung. Genaue Abläufe dieser Arbeitsschritte werden in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben.

2.7.1 Sägen der nativen Wirbelsäulen

Für die Herstellung der histologischen und immunhistologischen Präparate wurde eine Blattsäge mit Diamantschneideblatt (Modell EXAKT 310; Fa. EXAKT Apparatebau, Deutschland) verwendet (siehe Abbildung 3). Das Gerät besteht aus einer über zwei elektrisch angetriebene Rollen laufenden Schneide, die über zwei Führungsräder in ihrer Position gehalten wird und einer beweglichen Brücke, an der die zu sägenden Wirbelsäulenstücke befestigt werden. Das Schneideblatt wird mittels automatisch auf das Blatt aufgespritzten Wassers gekühlt und so eine Überhitzung des Blattes und etwaige Beschädigungen des Präparates durch die heiße Schneide verhindert.

An die Brücke wird über einen Faden ein Gewicht definierter Schwere (150 g), das über eine kleine Führungsrolle läuft, befestigt. Diese Konstruktion ermöglicht es über die gesamte Zeit des Sägevorganges einen kontinuierlich vorhandenen, gleichförmigen Sägedruck aufrecht zu erhalten und damit exakte Schnitte durchzuführen. Die Bewegung der Brücke relativ zum Sägeblatt kann über eine Mikrometerschraube reguliert werden. Die Geschwindigkeit des Sägeblattes kann in zehn Abstufungen stufenlos eingestellt werden. Für die Sägeschnitte wurde immer die Geschwindigkeit der Stufe sieben verwendet. Auf dieser Stufe zeigte sich nach im Labor bereits vorhandenen Erfahrungen der beste Kompromiss zwischen Geschwindigkeit des Vorgangs und Gewebeschonung.



Abbildung 3: Säge "EXAKT 310"

Die Sägeprozedur begann mit der Entnahme der Wirbelsegmente aus der Fixierungslösung und deren ausführlicher Wässerung unter fließendem Wasser zur Reduzierung der toxischen Belastung durch Formalindämpfe. Nach intensiver Wässerung wurde zunächst das kraniale Segment in die Haltevorrichtung der Säge eingespannt und gut fixiert. Zuerst wurde nach genauer Einstellung die Plastikbettung auf einer Seite unter Erhaltung möglichst viel Gewebes abgesetzt. Anschließend wurde das Wirbelsäulensegment so zur Säge positioniert, dass es in axialer Richtung gesägt werden konnte. Die Wirbelkörper wurden nun exakt zur Position des Sägeblattes ausgerichtet. Dazu wurden die *Prozessus transversi* horizontal positioniert, der *Prozessus spinosus* zeigte zur Raumdecke, die der Schneide zugewandte Fläche

des kranialen Wirbelkörpers stand vertikal im Raum. Eine etwaige Deviation der Processus spinosi war für die weitere Behandlung der Präparate unerheblich und fand keine weitere Beachtung. Nach nochmaliger Kontrolle der korrekten Position wurde mit dem Sägevorgang begonnen. Zunächst wurde ein medianer Schnitt durch die Mitte des Wirbelkörpers geführt. War der mediane Schnitt erfolgt wurden drei weitere paramediane Schnitte jeweils links und rechts des medianen Schnittes durchgeführt. Für die paramedianen Schnitte wurde die Brücke mitsamt dem daran befestigten Präparat mit der Mikrometerschraube um jeweils genau vier Millimeter weiterbewegt. Auf diese Weise entstanden sechs Scheiben von jeweils 4 Millimeter Dicke, drei links und drei rechts der medianen Achse. Die Schnitte wurden beginnend auf der linken Seite des Präparates alternierend mit fortlaufenden Zahlen benannt (siehe Abbildung 4). Stellte sich während des Sägens heraus, dass das Implantat nicht mittig gelegen war, so wurden ebenfalls im Abstand von vier Millimeter weitere Schnitte angefertigt, bis das Implantat mit allen Anteilen enthalten war. Die Nummerierung wurde fortgeführt. Für diesen Fall wurden die aufgrund der exzentrischen Lage kein Implantat enthaltenden Schnitte verworfen. Waren alle Schnitte angefertigt, wurde die kaudale Plastikeinbettung abgesägt. Um später die Möglichkeit der Orientierung am geschnittenen Präparat zu haben, wurden die soeben angefertigten Schnitte an der Medialseite und kaudal mit einer Bleistiftmarkierung versehen (siehe Abbildung 5).

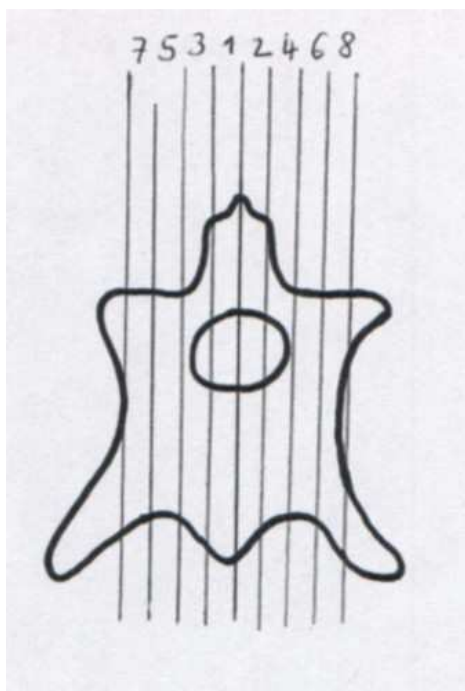


Abbildung 4: Sägeprotokoll



Abbildung 5: Sägescheibe mit Markierung medial-kaudal

Die angefertigten Sägeschnitte wurden dann so für die folgenden histologischen und immunhistologischen Untersuchungen aufgeteilt, dass von den benachbarten Schnittflächen jeweils eine konventionell histologisch und eine immunhistologisch untersucht werden konnte und getrennt gelagert. Schnittscheiben, die keinerlei Implantat enthielten wurden verworfen. (Die konventionell-histologischen Untersuchungen wurden von einem weiteren Teammitglied durchgeführt und sind an anderer Stelle beschrieben.)

2.7.2 Aufarbeitung der Präparate

Nachdem die Sägeschnitte angefertigt und die Auswahl für histologische und immunhistologische Auswertung getroffen war, wurden die Wirbelscheiben mit dem Studiencode des jeweiligen Tieres versehen (siehe Anhang; 6.1). So gekennzeichnet wurden sie einzeln in eine Mullkompressen verpackt und in Fixierungslösung gelagert. Die Fixierungslösung besteht aus 37 %iger Formalinlösung (Anteil an der Fixierlösung 30%), 100 %igem Alkohol (Anteil 54 %), 0,1molarem Barbitol-Natrium-Puffer pH 7,3 (Anteil 16 %) und Glukose. In dieser Lösung verblieben die Präparate für mindestens vier, durchschnittlich sieben Tage. Durch die Fixierung wurden die Strukturen aufgrund von Quervernetzungen der Proteine in ihrer strukturellen Beziehung zueinander erhalten und autolytische Prozesse sowie enzymatische Proteolyse durch zelluläre Proteasen wurden verhindert.

Nach der oben genannten Fixierungszeit von zumeist sieben Tagen wurden die Präparate aus der Fixierungslösung entnommen. Die Spondylodeseimplantate wurden vorsichtig unter maximal möglicher Schonung des Gewebes mit einem Skalpell entfernt. Dies war für den später folgenden Schneidevorgang mit dem Mikrotom unerlässlich. Ließen sich die Implantate nur sehr schwer oder gar nicht entfernen wurde die Fixierung für einige Tage fortgesetzt und nach dieser Zeit ein erneuter Versuch unternommen.

Nach der Entfernung der Implantate wurden diese für insgesamt mindestens acht Wochen zur Entkalkung in EDTA-Lösung (Fa. Herbeta Arzneimittel, Deutschland) aufbewahrt. Die Aufbewahrung fand im Wärmeschrank bei 37°C statt. Während dieser acht Wochen wurde die Entkalkungslösung wöchentlich gewechselt.

Nach Ablauf des entsprechenden Zeitraumes wurde das Ergebnis der Entkalkung anhand der Härte der Präparate durch manuelle Palpation überprüft. Es folgte die Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe. Hierfür wurde ein Entwässerungsautomat (TP 1020, Fa. Leica, Deutschland) verwendet. Nach Wahl des im Studienprotokoll vorgesehenen Programms startete die Entwässerung mit den in dem gewählten Programm voreingestellten Zeitdauern. Details des Entwässerungsprogramms sind dem Anhang zu entnehmen. Nach Beendigung des Entwässerungsvorganges wurden die Präparate aus dem Entwässerungsautomaten entnommen. Anschließend erfolgte die kurzfristige Lagerung in warmem Paraffin bei konstanter Temperatur von 60°C im Wärmeschrank bis zur Einbettung.

2.7.3 Einbetten der Präparate

Nach insgesamt 72stündiger Entwässerung im Entwässerungsautomaten mit abschließender Lagerung in flüssigem, warmem Paraffin wurden die Präparate hieraus entnommen und die Einbettung in Paraffin wurde wie folgt vorgenommen:

Zunächst wurde eine Kühlplatte (EG 1130, Fa. Leica, Deutschland) auf eine Temperatur von -12°C gebracht. Das Paraffin (Gewebeeinbettungsmedium; Fa. McCormick™ Scientific, USA) wird im Labor in Form fester Flocken angeschafft und in einem speziell dafür vorgesehenen Kocher mit Abfüllhahn (EG 1120; Fa. Leica, Deutschland) auf eine Temperatur von 60°C erhitzt. Bei dieser Temperatur wird das Paraffin flüssig und es wird in eben diesem Zustand im Reservoir des Kochers zur Verwendung vorgehalten. Als Form für den Paraffinblock wurden individuell der Präparatgröße angepasste Aluminiumformen verwendet und vor der Verwendung auf der gekühlten Platte temperiert. Es wurde eine dem Volumen der Form adaptierte Menge heißes Paraffin (60°C) in die Form gegeben. Dabei wurde auf zügiges Arbeiten geachtet, um Schichtbildung im Block zu vermeiden. Der Wirbelsäulenabschnitt wurde nun in das noch flüssige Paraffin auf den Boden des entstehenden Paraffinblocks gedrückt. Nach Kennzeichnung mit dem Studiencode härtete das Paraffin auf der Kühlplatte aus. Der Aushärtvorgang war nach zirka einer Stunde abgeschlossen (siehe Abbildung 6).

Nach vollständiger Aushärtung wurden die Paraffinblöcke bis zum Zeitpunkt der weiteren Bearbeitung bei Zimmertemperatur gelagert.

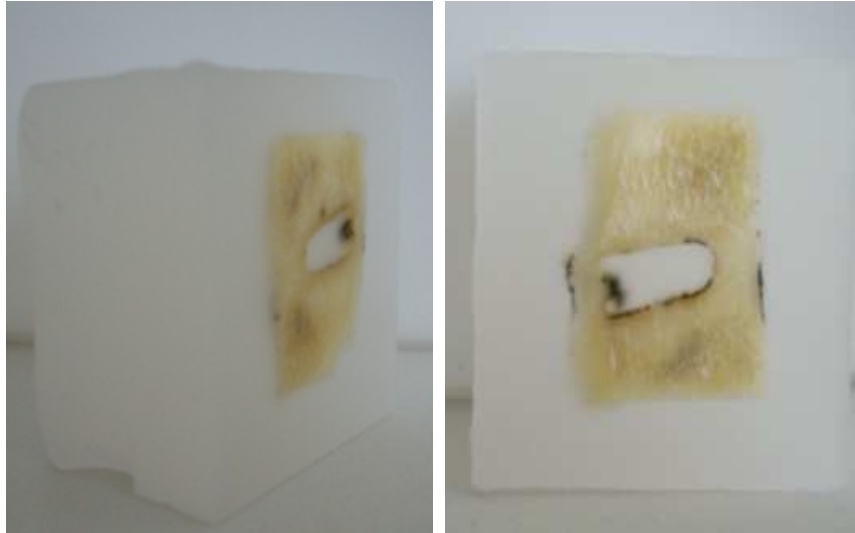


Abbildung 6: Paraffinblock mit enthaltenem Sägeschnitt, Cage entfernt

2.7.4 Schneiden der Präparate

Das Schneiden der in Paraffinblöcke eingebetteten Präparate erfolgte mit einem Rotationsmikrotom (JUNG RM 2055; Fa. Leica, Deutschland). Die Schichtdicke der Schnitte betrug jeweils 4 μm . Die angefertigten Schnitte wurden sofort nach dem Schneiden in einem Wasserbad zwischengelagert. Anschließend wurden die Schnitte bei gleichzeitiger Glättung im warmen Wasserbad (44° C) auf einen Objektträger aufgezogen. Danach erfolgte das Trocknen in einem Wärmeschrank bei einer Temperatur von konstanten 37° C. Nach vollständiger Trocknung, welche erfahrungsgemäß nach drei Tagen abgeschlossen war, wurden die Objektträger bis zur Färbung bei Zimmertemperatur gelagert.

2.7.5 Färben der Präparate

2.7.5.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase

Zunächst wurden die Präparate in Xylol entparaffiniert und direkt im Anschluss daran in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach Herstellung der Puffer- und Färbelösungen erfolgte die Pufferung der Präparate und anschließend der Färbevorgang durch Einstellen der Präparate in die Färbelösung und zweistündiger Inkubation in den Färbeküvetten bei 37° C. Nach erfolgter Inkubation wurde der Färbeerfolg unmittelbar mikroskopisch kontrolliert. Bei erfolgreicher Färbung der sauren Phosphatase wurden umgehend die Zellkerne gegengefärbt. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol wurde auf die Objektträger mit den Präparaten

zum Schutz vor Austrocknung ein Deckglas aufgeklebt (Vitroclud[®], Einschlussmittel für mikroskopische Technik; Fa. R. Langenbrinck, Deutschland). Bis zur Aushärtung des Klebers, mindestens jedoch einen Tag, wurden die Objektträger bei Raumtemperatur unter einem Abzug gelagert.

Weitere Details des Färbevorganges sind dem Anhang (6.4.1) zu entnehmen.

2.7.5.2 Alpha smooth-muscle actin

Als interner Kontrollparameter wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde die Inkubation mit dem primären Antikörper unterlassen.

Dieser Färbevorgang begann ebenfalls mit der Entparaffinierung und Rehydrierung der Präparate in Xylol und absteigender Alkoholreihe. Nach Einstellung des pH-Wertes mittels PBS-Puffer und Inkubation mit dem erforderlichen Normalserum erfolgte das Aufbringen des monoklonalen Antikörpers gegen das alpha-glattmuskuläre Aktin (Monoclonal mouse anti-human, clone 1A4; Fa. DAKO, USA). Die Präparate wurden zum Schutz vor Austrocknung in einer feuchten Kammer gelagert und über Nacht bei +4° C inkubiert. Für die Darstellung der Antikörperbindung wurde neben dem spezifischen Sekundärantikörper der Avidin-Biotin-Komplex verwendet. Nach Zugabe des entsprechenden Substrates zeigte sich der Färbeerfolg durch rote Farbgebung. Die Entwicklung der Färbung erfolgte unter mikroskopischer Sichtkontrolle. Auch bei dieser Färbung wurde im Anschluss eine Zellkerngegenfärbung durchgeführt und nach Entwässerung wurden die gefärbten Präparate durch Aufkleben eines Deckglases geschützt.

Weitere Details dieses Färbevorganges finden sich im Anhang (6.4.2).

2.7.6 Digitalisierung der Präparate

Die gefärbten und eingedeckten Präparate wurden zur weiteren Bearbeitung, Auswertung, platzsparenden Archivierung und zum Schutz vor Qualitätsverlust (Ausbleichen der Färbung durch Umgebungslicht) in eine digitale Form überführt. Die Digitalisierung der Präparate geschah mit einer speziell für diesen Zweck angefertigten Apparatur.

Die Apparatur besteht aus einem Mikroskop (Axioskop40), einer auf dem Mikroskop montierten Kamera (AxioCam MRc5) und einem PC mit spezieller Bildaufnahme- und –verarbeitungssoftware (AxioVision40, Version 4.6.3.0; alles Fa. C. Zeiss, Deutschland).

Nachdem der Objektträger auf dem Tisch des Mikroskops befestigt worden ist, wurden am Mikroskop und im PC-Programm Standardeinstellungen verschiedener Werte vorgenommen (Fokus, Helligkeit, Weißabgleich, Farbkorrektur, Kameraempfindlichkeit, Auflösung).

Zur Aufnahme des Bildes wurde im Programm Axiovision die Aufnahmeoption Mosaik[®] gewählt. Durch Mosaik[®] wurde das Präparat mit Hilfe eines Motortisches durch die Kamera großflächig abgescannt, um ein digitales Abbild davon zu erzeugen. Das Präparat musste bei dieser Art der Bildaufnahme nur einmal gescannt werden und stand dann sofort für alle weiteren Bearbeitungs- und Analyseschritte zur Verfügung. Vor dem Start des Scanvorganges wurde der Fokus in der zehnfachen Vergrößerung des Mikroskops am von der Kamera gelieferten digitalen Echtzeitbild eingestellt. Um ein möglichst pixelgenaues Zusammensetzen der einzelnen Bilder zu erreichen wurde die korrekte Tischkalibrierung sowie die exakte Ausrichtung der Kamera sichergestellt. Die Bilder wurden nach Starten des Scanvorganges automatisch aneinander gesetzt. Um die korrekte Positionierung aller Bilder zueinander zu garantieren wurde das Verfahren des „Stitching“ („Zusammenheften“) angewendet. Es wurde dabei vom Programm anhand der Bildstrukturen aneinander grenzender Bilder überprüft, ob die Grenzen wirklich korrekt zusammen passen. Sollte dies nicht der Fall gewesen sein, wurden die Bilder anschließend korrekt zueinander positioniert. Der „virtuelle, digitale Objektträger“ wurde dann unter dem Studiencode (siehe Anhang; 6.1) eindeutig identifizierbar gespeichert. Die durchschnittliche Dateigröße betrug ca. 20 MB.

2.7.7 Auswerten der Präparate

Für die Auswertung der digitalen Objektträger wurde ein handelsüblicher PC mit 2048 MB Hauptspeicher (PC2-5300 (667 MHz), DDR2 SODIMM; Fa. Samsung, Südkorea) verwendet, um die Datenmenge der digitalen Bilder bewältigen zu können. Die Auswertung wurde mit dem PC-Programm Adobe[®] Photoshop[®] 10.0 CS 3 Extended durchgeführt.

Jeweils ein digitaler Objektträger wurde in das Programm geladen (siehe Abbildung 7). Mittels Zauberstab-Werkzeug wurde die exakte Grenze des Cages zum umgebenden Gewebe markiert (siehe Abbildung 8). Diese soeben gesetzte Markierung wurde nun um genau einen Millimeter in das Gewebe hinein verschoben (siehe Abbildung 9). Als interne Größenorientierung diente dabei ein bei der Digitalisierung eingefügter Maßstabsbalken (in den Abbildungen nicht gezeigt, da lediglich ein Ausschnitt des Präparates zu sehen ist). Es wurde die Pixelanzahl des Maßstabsbalkens bei 1 mm Länge gemessen. Bei den verwendeten Einstellungen und Vergrößerungen ergaben 926 Pixel genau einen Millimeter. Um genau diese Pixelanzahl wurde dann die Markierung erweitert. Die Kontur der Markierung wurde mit einem farbigen Strich umrandet. Diese Markierung umschreibt die region-of-interest (ROI) innerhalb derer die Auswertung stattfand.

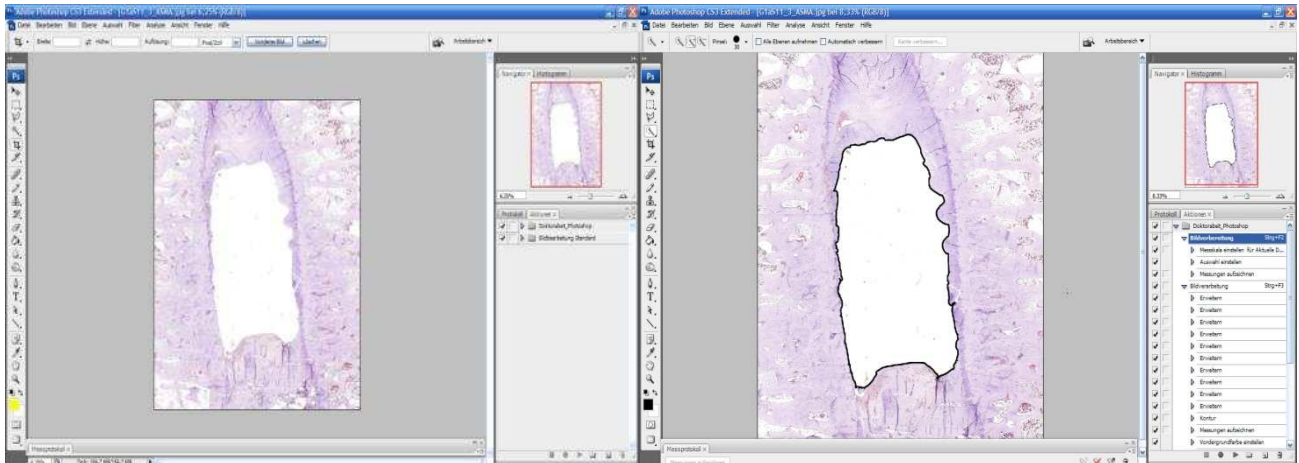


Abbildung 7: Digitalisiertes Präparat unbehandelt

Abbildung 8: Markierung der Grenzfläche

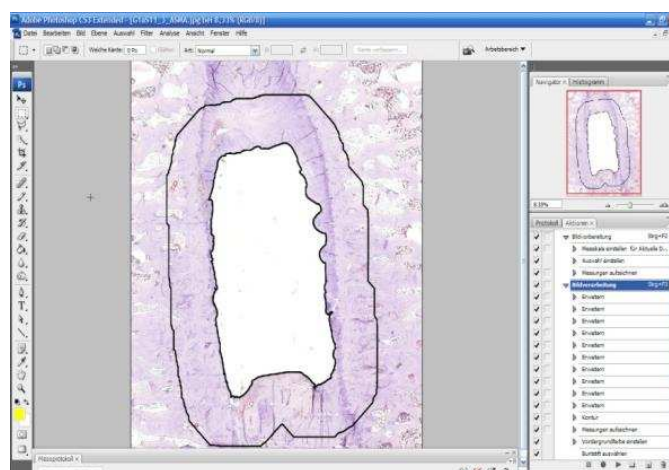


Abbildung 9: Markierung der endgültigen ROI

Das Zählen der interessierenden Strukturen erfolgte mit Hilfe des Zählungswerkzeuges des Grafikprogramms. Es wurden dafür die entsprechenden Strukturen im Prä-

parat markiert, die Zählung der Markierungen erfolgte automatisiert durch das Programm. Die von Photoshop zurückgegebene Anzahl der markierten Strukturen wurde dann in eine Microsoft® Excel®-Tabelle exportiert und dort gespeichert (siehe Tabelle 8, Anhang).

Um einen Lerneffekt bei der Auswertung der Zellen und Gefäße auszugleichen wurden die digitalen Präparate zufällig und keiner Ordnung folgend bearbeitet.

2.7.7.1 Auswertung der Osteoklastenanzahl

Zur Beurteilung der osteolytischen Aktivität im Präparat wurden aktive Osteoklasten als Marker verwendet. Diese lassen sich durch die selektive Färbung der von ihnen im aktiven Zustand gebildeten Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) darstellen (siehe Abbildung 10). Für die Auswertung wurde folgende Definition verwendet:

Als aktive Osteoklasten wurden Zellen definiert, welche

- unmittelbaren Knochenkontakt haben,
- die Tartrat-resistente saure Phosphatase exprimieren (Aktivitätsmerkmal),
- mehrkernig sind.

Diese Kriterien erfüllten die Voraussetzungen der notwendigen Bedingung, das bedeutet alle diese Kriterien mussten für eine einzelne Zelle zutreffen, damit sie als aktiver Osteoklast definiert und damit als für die Auswertung relevant erkannt wurde. Selbstverständlich galt dies nur für entsprechende Zellen innerhalb der zuvor markierten ROI.

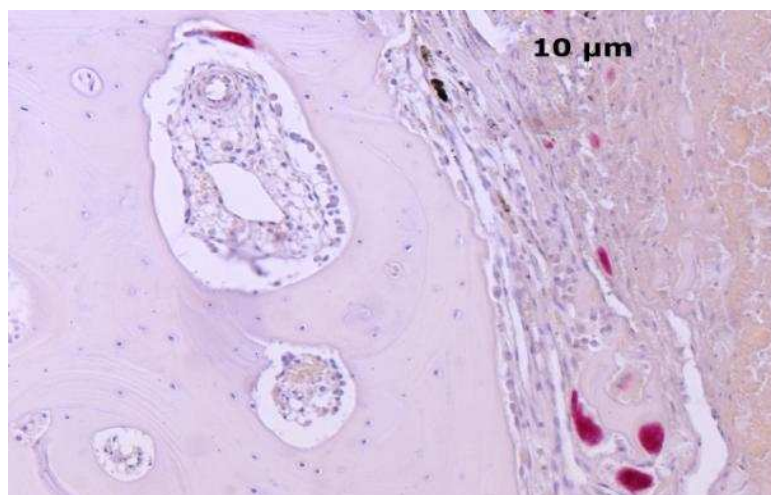


Abbildung 10: Mit einer Spezialfärbung markierte Tartrat resistente saure Phosphatase in Osteoklasten

2.7.7.2 Auswertung der Neovaskularisation

Zur Beurteilung der aseptischen Entzündungsreaktion wurden als Marker die Gefäße herangezogen. Diese lassen sich durch selektives Anfärben des Alpha-glattmuskulären-Aktins (ASMA) darstellen (siehe Abbildung 11). Für die Auswertung wurde folgende Definition verwendet:

Es wurden alle Gefäße und Kapillaren innerhalb der ROI, unabhängig von ihrem Kaliber erfasst.

Als Gefäße wurden Strukturen definiert, die eine

- deutliche Gefäßwand haben, und
- immunhistologische Anfärbbarkeit zeigen.

Auch diese Kriterien sind als notwendige Kriterien anzusehen, die alle gleichzeitig auf eine Struktur zutreffen mussten, damit diese als Gefäß im Sinne der Definition galt.

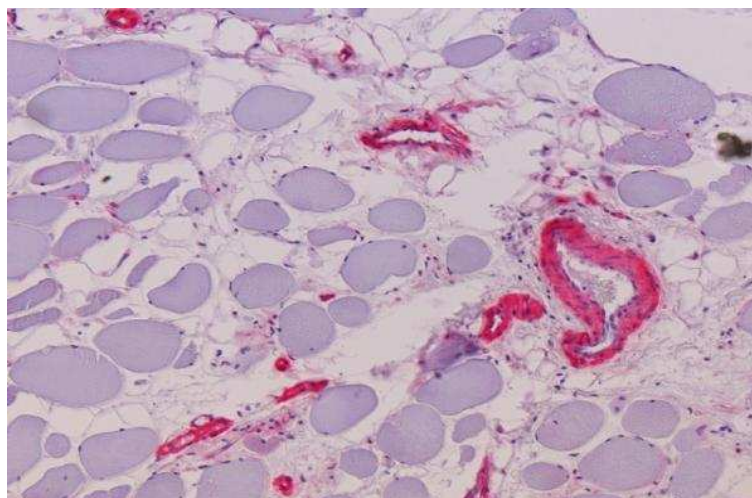


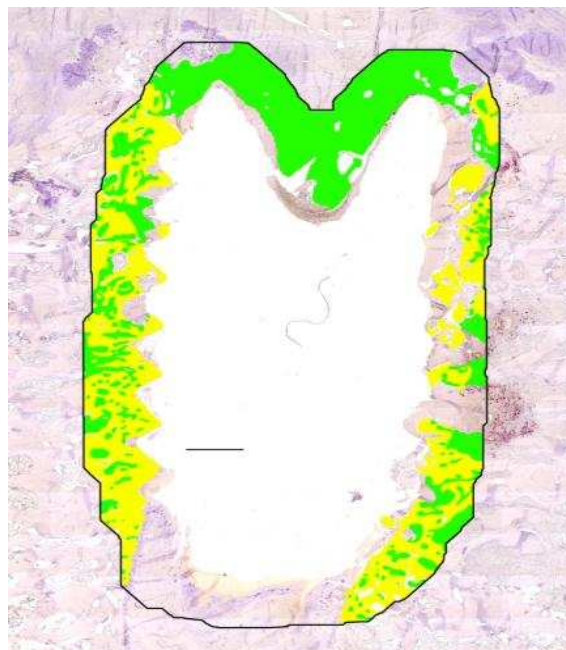
Abbildung 11: Mit spezifischen Antikörpern gegen α -smooth-muscle-actin angefärbte Gefäße

2.7.7.3 Bestimmung der Referenzflächen

Als interner Bezugsparameter innerhalb des jeweils auszuwertenden Präparates wurden die in der ROI enthaltenen Flächen von Knochen und Bindegewebe herangezogen.

Die Markierung der ROI erfolgte wie oben bereits beschrieben. Anschließend wurde zunächst die Knochenfläche farbig markiert. Die Markierung erfolgte mit dem Buntstift-Werkzeug des für die Auswertung benutzten Computerprogrammes. Waren alle Knochenflächen markiert wurde über das Auswahlménü die für die Markierung der Knochenflächen verwendete Farbe ausgewählt. Das Programm wählte auf diese Option hin alle der jeweiligen Farbe entsprechenden Flächen aus. Die Messung der Referenzflächen erfolgte als Summation aller gleichfarbigen Flächen bis auf die sechste Nachkommastelle genau. In gleicher Weise wurde mit der Bindegewebsfläche des Präparates verfahren (siehe Abbildung 12).

Die Differenzierung der einzelnen Gewebe erfolgte aufgrund der Kennerschaft und mikroskopisch-histologischen Erfahrungen des Auswerters. Die gemessenen Daten wurden vom Programm in einer Textdatei exportiert und gespeichert. Anschließend wurden die Daten aus der Textdatei mittels Tastaturbefehl kopiert und in die Excel®-Tabelle eingefügt (siehe Tabelle 7; Anhang).



**Abbildung 12: Digitales Präparat mit Markierung der Referenzflächen innerhalb der ROI.
Gelb: Knochen, Grün: Bindegewebe**

2.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde derselbe handelsübliche PC mit 2048 MB Hauptspeicher (PC2-5300 (667 MHz), DDR2 SODIMM; Fa. Samsung, Südkorea)

verwendet, mit dem auch schon die digitale Auswertung der mikroskopischen Präparate erfolgte. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS® in der Version 16.0 (SPSS Inc., USA) vorgenommen.

Um die Berechnung durch das Statistikprogramm möglich zu machen wurden zunächst die Textwerte (Studiencode, Implantat, Segmente) in Zahlenwerte überführt. Dazu wurde jedem Versuchstier eine fortlaufende Ziffer zugeordnet. Jeder der drei Implantatgruppen wurde ebenfalls eine Ziffer zugeordnet. Auch die Segmente (kranial/kaudal) wurden mittels einer Ziffer kodiert. Die Kodierungslegende befindet sich in Tabelle 9 im Anhang.

Aufgrund unterschiedlicher Anzahl an immunhistologisch auswertbaren Präparaten (variable Implantatlage, siehe Ergebnisse) war es notwendig aus den erhaltenen Daten für Osteoklasten pro Quadratmillimeter und Gefäßen pro Quadratmillimeter zunächst den Mittelwert für jedes Tieres zu berechnen. Ein vor Beginn der Berechnungen durchgeführter Shapiro-Wilk-Test war nicht signifikant. Dieses Ergebnis bestätigt eine Normalverteilung der Daten. Die Verwendung des Mittelwertes für die Berechnungen ist damit statthaft. Gleichzeitig wurde die Standardabweichungen für alle auszuwertenden Untergruppen berechnet (Tiere, Implantatgruppen, Segmente, Zeitpunkte).

Für die durchgeführten statistischen Tests wurden die zuvor errechneten Mittelwerte für Osteoklasten pro Quadratmillimeter bzw. Gefäße pro Quadratmillimeter als abhängige Variable eingesetzt. Die Art des Implantates, der Zeitpunkt der Tötung des Tieres und das Wirbelsäulensegment wurden als unabhängige Variablen eingesetzt. Mit diesen Parametern wurde die statistische Testung durchgeführt.

Zunächst wurde eine lineare Regressionsanalyse für die Variablen durchgeführt. Im Anschluss daran wurde ein allgemeines lineares Modell (ANOVA) für die Daten gerechnet. Die Berechnungen wurden für das kraniale und das kaudale Segment separat durchgeführt. Anschließend wurden dieselben statistischen Berechnungen mit den Segmenten als unabhängige Variable und wiederum den Osteoklasten bzw. Gefäßen als abhängige Variable durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden aus dem Programm exportiert und gesondert gespeichert.

3 Ergebnisse

3.1 Operationen

Insgesamt wurden die Spondylodeseoperationen an 39 Tieren durchgeführt. Von diesen 39 Tieren konnten 33 Tiere für die weitere Auswertung herangezogen werden, bei sechs Tieren kam es zu Zwischenfällen, die einen weiteren Verbleib in der Studie unmöglich machten. Zum Ausschluss kam es aufgrund der im Folgenden genannten Umstände.

Narkosezwischenfälle und postoperative akute Querschnittslähmungen führten zum Verlust von drei Tieren in Gruppe drei und einem Tier in Gruppe eins. In Gruppe eins kam es zum Verlust eines weiteren Tieres durch eine intraoperative, vaskuläre Komplikation. Ein Tier verstarb postoperativ ohne offensichtlichen Grund. Bei der Obduktion dieses Tieres konnte eine hämorrhagische Lunge festgestellt werden, vermutlich handelte es sich um eine fulminante Lungenembolie.

Alle weiteren Operationen wurden erfolgreich und komplikationslos beendet, postoperativ hatten alle 33 Tiere einen komplikationslosen Verlauf in ihren verbleibenden sechs bzw. zwölf Lebenswochen. Die Tiere zeigten zu keinem Zeitpunkt Bewegungseinschränkungen oder eine fokale neurologische Ausfallssymptomatik. Bis zum Zeitpunkt der Tötung gab es keinerlei Infektionen, weder lokal im Bereich der Wunde noch systemisch. Bereits wenige Tage postoperativ konnte bei allen Tieren ein physiologisches Gangbild festgestellt werden. Schmerzäußerungen waren nur sehr kurzzeitig postoperativ festzustellen und zeigten nur eine geringe Intensität. Nach wenigen Tagen sistierten sie komplett und traten im weiteren postoperativen Verlauf auch nicht wieder auf.

3.2 Aufarbeitung der Wirbelsäulen

Beim Sägen der Wirbelsäulen von zwei Tieren (ein Tier in Gruppe zwei und ein Tier in Gruppe vier) zur Vorbereitung der immunhistologischen Untersuchungen wurde ein „drop-out“ des Cages festgestellt. Das bedeutet, dass in beiden Fällen das Spondylodeseimplantat keinen Kontakt mehr zu den Wirbelkörpern hatte und nur noch von den umgebenden Weichgeweben gehalten wurde ($\hat{=}$ totale Luxation). In beiden Fällen handelte es sich um das kaudale Segment des jeweiligen Tieres. Durch den

fehlenden Knochenkontakt war eine Auswertung dieser Segmente nicht möglich. Bei einigen wenigen weiteren Segmenten konnte eine Verschiebung der intraoperativ hergestellten Lage des Implantates relativ zu den angrenzenden Knochenflächen festgestellt werden ($\triangleq$ Subluxation). Die Abweichungen waren jedoch insgesamt gering und es bestand immer noch eine quantitativ gute Kontaktfläche zum Knochen. Die Verschiebungen wurden zur Kenntnis genommen und jede einzeln beurteilt. Die Subluxationen wurden in keinem Fall als relevant bzw. problematisch für die Auswertung und das Ergebnis insgesamt erachtet. Bei allen weiteren Aufarbeitungsschritten und der Auswertung erfolgte aus diesem Grund keine gesonderte Berücksichtigung dieser speziellen Segmente.

3.3 Immunhistologische Untersuchung

Für die immunhistologische Untersuchung standen nach der Tötung der Tiere und Separierung der Segmente insgesamt 64 Wirbelsäulensegmente mit orthotop enthaltenen Spondylodeseimplantaten zur Verfügung. Nach dem Sägevorgang der Segmente wurden der immunhistologischen Untersuchung 158 Wirbelsäulenscheiben zur weiteren Bearbeitung zugeordnet. Diese Anzahl konnte über die folgenden Bearbeitungsschritte hinweg beibehalten werden.

Bei der digital-mikroskopischen Auswertung nach Färbung konnte bei sieben Präparaten keine ROI im Präparat gezogen werden, da die Lage des Implantates im Präparat nicht mehr nachzuvollziehen war. Diese Präparate wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. So konnten schließlich 151 Präparate je Färbung zur Auswertung herangezogen werden.

Die Verteilung der Tiere und Segmente auf die verschiedenen Auswertungsgruppen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zuordnung der Tiere und Segmente zu den Auswertungsgruppen. (Anzahl der ausgewerteten Segmente in Klammern)

	Titanoxid	plasma-sprayed-titanium	APC
Gesamtanzahl Tiere (Segmente)	11 (21)	12 (23)	10 (20)
Zeitpunkt 6 Wochen Tiere (Segmente)	5 (10)	5 (10)	5 (10)
Zeitpunkt 12 Wochen Tiere (Segmente)	6 (11)	7 (13)	5 (10)
kraniale Segmente	11	12	10
kaudale Segmente	10	11	10

3.4 Subjektive Einschätzung von Delaminationen

In einigen vorangegangenen Studien wurde von Delaminationen der Oberfläche von plasma-sprayed-Implantaten berichtet (siehe Einleitung). Obwohl die Untersuchung von Oberflächendelaminationen nicht Ziel vorliegender Auswertung war, entstand bei der mikroskopischen Betrachtung beim Auswerter dennoch der subjektive Eindruck, dass es in der Gruppe der APC-behandelten Implantate weniger Partikelabrieb im umgebenden Gewebe zu geben schien, als in der plasma-sprayed-Gruppe. Die Quantifizierung dessen wurde von einem anderen Mitglied des Forschungsteams übernommen und ist nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

3.5 Einzelauswertung der untersuchten Parameter

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse werden zusätzlich zur verbalen Beschreibung der ausgewerteten Parameter Grafiken dargestellt. Bei den Grafiken handelt es sich um Balkendiagramme, bei denen die Werte unterhalb des Mittelwertes als schraffierte Fläche, der Mittelwert als obere Begrenzung der schraffierten Fläche und die Werte oberhalb des Mittelwertes als Fehlerbalken dargestellt werden. Jeder Balken der Abszisse repräsentiert eine Subgruppe, die Ordinate beschreibt die absoluten Zahlenwerte der den einzelnen Subgruppen zugehörigen Parameter.

Da für alle Tiere mehrere Objektträger zur Auswertung gelangten wird in den Abbildungen 13, 14, 22 und 23 für jedes Tier einzeln die Verteilung der entsprechenden Parameter dargestellt. Bei diesen Grafiken handelt es sich um klassische Whiskers-Boxplots, bei denen die Quartilen durch den Kasten, der Median durch den Querbalken innerhalb des Kastens und die minimalen und maximalen Werte durch die Fehlerbalken dargestellt werden. Es werden bei diesen Grafiken auf den Abszissen einzeln die ausgewerteten Tiere aufgetragen, auf der Ordinate sind die absoluten Zahlenwerte der den einzelnen Tieren jeweils zugehörigen Parameter dargestellt. Eine Sortierung nach Auswertungsgruppen erfolgt bei den Grafiken noch nicht.

3.5.1 Intraindividuelle Varianz der Osteoklastenzahl

Die absoluten Osteoklastenzahlen werden zur Berechnung des relativen Parameters Osteoklasten pro mm² Knochenfläche benötigt, der zum Vergleich der Gruppen herangezogen wird. Die Ergebnisse der Osteoklastenzählung stellen sich über die Gesamtzahl der ausgewerteten Tiere sehr homogen dar. Es gab nur sehr vereinzelt Tiere, bei denen extrem streuende Werte und deutliche Abweichungen von den insgesamt über die Auswertung aller Tiere gefundenen absoluten Osteoklastenzahlen festgestellt wurden (vergleiche Abbildung 13). Der Grund hierfür ist nicht nachzuvollziehen, er konnte auch nicht ermittelt werden und bleibt daher unklar.

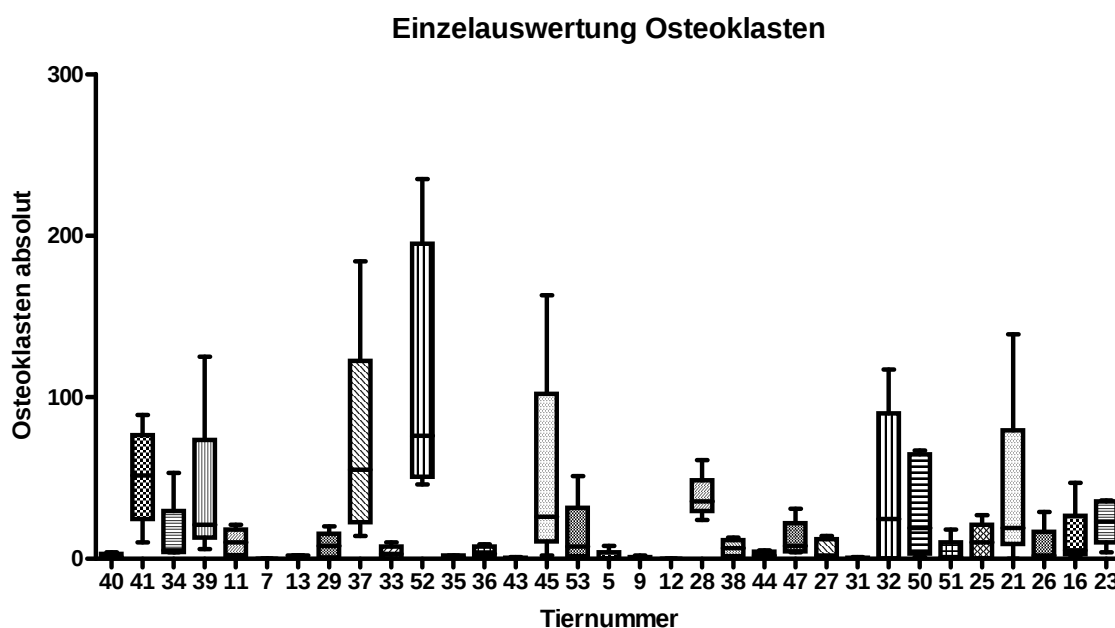


Abbildung 13: Darstellung der absoluten Osteoklastenzahl für jedes einzelne Tier (Daten jeweils zusammengesetzt aus mehreren Objektträgern)

3.5.2 Intraindividuelle Varianz der Knochenfläche

Bei der Erfassung der innerhalb der ROI enthaltenen Knochenfläche wurde eine deutlich größere Heterogenität der absoluten Zahlenwerte festgestellt, als dies für die Osteoklastenzahlen der Fall war. Diese Heterogenität zeigte sich bei den meisten Tieren der Studie (vergleiche Abbildung 14).

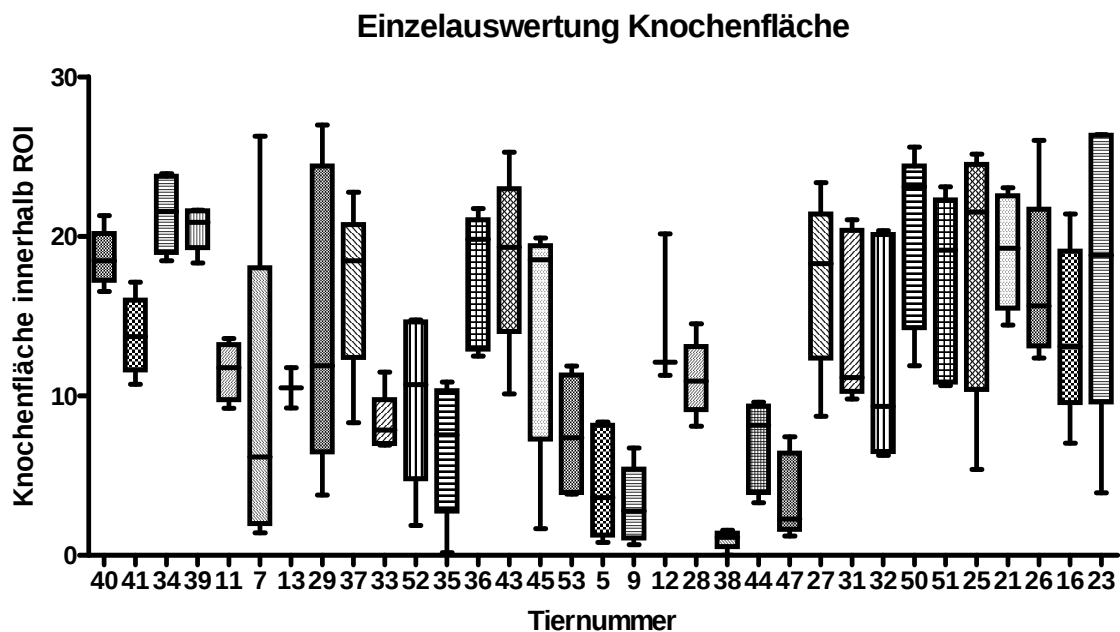


Abbildung 14: Darstellung der absoluten Knochenfläche für jedes einzelne Tier (Daten jeweils zusammengesetzt aus mehreren Objekträgern)

3.5.3 Auswertung Osteoklasten pro Knochenfläche

Die Analyse der Osteoklastenzahl pro mm^2 Knochenfläche bezüglich der verwendeten Materialien zeigte für die kaudalen Segmente eine absolut geringere Anzahl von Osteoklasten pro Quadratmillimeter Knochenfläche bei den APC-Implantaten im Vergleich zu den Ti-O_2 - und PS-Ti-Implantatgruppen (kaudal 0,8 (APC) gegenüber 1,9 (Ti-O_2) bzw. 2,6 (PS-Ti) Osteoklasten pro mm^2 Knochenfläche absolut). Für die kranialen Segmente zeigen sich bei APC und PS-Ti nahezu identische Werte, bei der Ti-O_2 -Gruppe lag der absolute Wert deutlich höher (kranial 2,0 (APC) gegenüber 3,2 (Ti-O_2) bzw. 1,9 (PS-Ti); vergleiche Abbildung 21 und Tabelle 2). In der Gesamtschau lässt sich bemerken, dass die APC-Gruppe insgesamt im Bereich der geringen absoluten Werte lag. Die lineare Regressionsanalyse für die abhängige Variable Osteoklasten/ mm^2 Knochenfläche und die unabhängige Variable Gruppe (entspricht dem verwendeten Material) ergab für das kraniale Segment eindeutig keine Signifi-

kanz ($p = 0,463$), für das kaudale Segment ergab sich ebenfalls kein signifikantes Ergebnis, hier ergab die lineare Regressionsanalyse einen Wert von $p = 0,347$. Die Berechnung der Zwischensubjekteffekte mit dem univarianten allgemeinen linearen Modell war bei der Berechnung für die Osteoklasten für das gesamte Modell getrennt nach Segmenten ebenfalls nicht signifikant (kranial $p = 0,822$, kaudal $p = 0,678$). Auch die Berechnung der Zwischensubjekteffekte für die Variable Implantat konnte weder für das kraniale noch für das kaudale Segment ein signifikantes Ergebnis zeigen (kranial $p = 0,745$, kaudal $p = 0,298$). Die R-Quadrat-Werte lagen für die lineare Regressionsanalyse bei 0,034 (kraniales Segment) bzw. 0,036 (kaudales Segment), die R-Quadrat-Werte für das allgemeine lineare Modell betrugen 0,074 für das kraniale und 0,112 für das kaudale Segment.

Nach der Betrachtung der Osteoklasten pro Quadratmillimeter Knochenfläche getrennt nach den verwendeten Materialien kann gesagt werden, dass in der APC-Gruppe insgesamt die geringste absolute Anzahl Osteoklasten pro mm^2 Knochenfläche und die geringste Streuung der Absolutwerte vorhanden ist, dieses Ergebnis jedoch statistisch in keiner durchgeführten Berechnung signifikant ist.

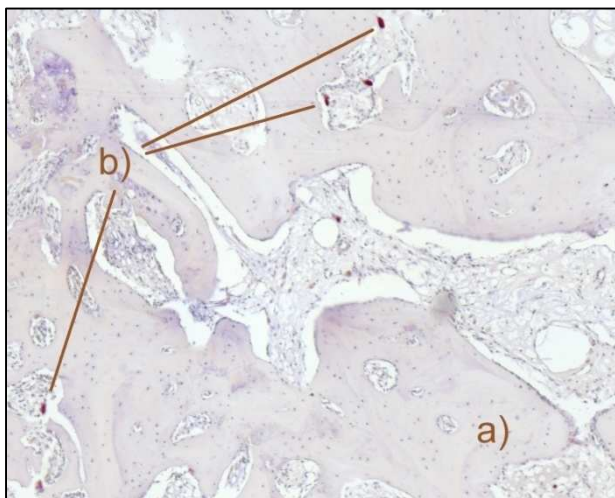


Abbildung 15: Osteoklasten Ti-O₂ nach 6 Wochen

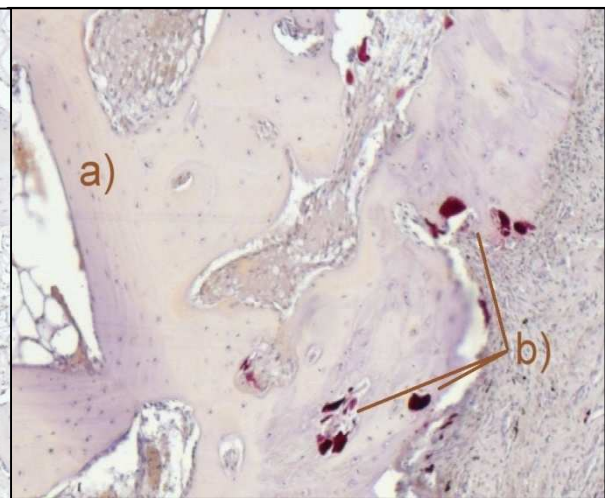


Abbildung 16: Osteoklasten PS-Ti nach 6 Wochen

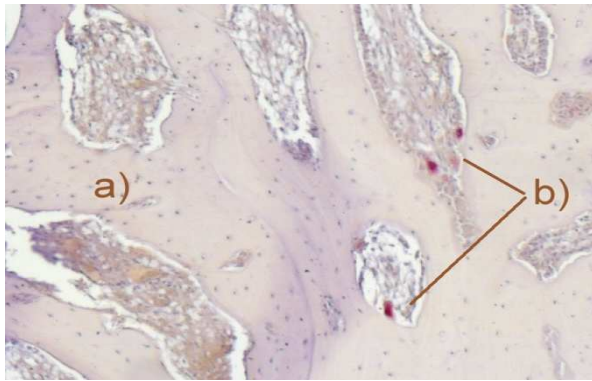


Abbildung 17: Osteoklasten APC nach 6 Wochen

Abbildungen 15-17: Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte histologischer Präparate der Schichtdicke 4 µm in einer zehnfachen Mikroskopvergrößerung in der TRAP-Färbung zum Zeitpunkt 6 Wochen nach Implantation der Spondylodesecages. Rot gefärbt und mit dem Buchstaben b) bezeichnet sind Osteoklasten (die Pfeile bezeichnen Beispiele, nicht zwangsläufig alle im Bild enthaltenen Osteoklasten), Knochenstrukturen sind mit dem Buchstaben a) bezeichnet. Diese repräsentativen Ausschnitte zeigen einen Unterschied in den Quantitäten der PS-Ti Gruppe zu den anderen beiden Gruppen, Ti-O₂ und APC Gruppen unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Osteoklastenquantitäten. Diese Unterschiede sind statistisch jedoch nicht signifikant.

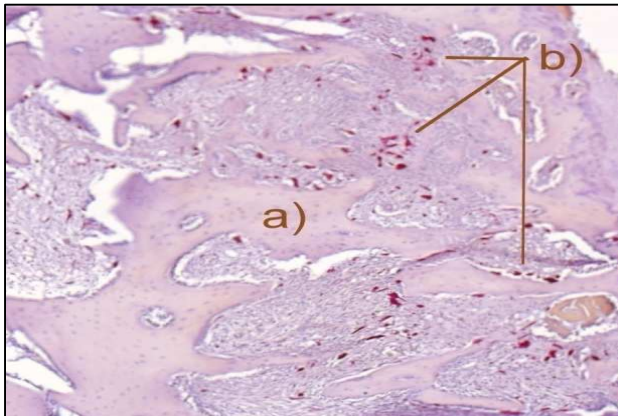


Abbildung 18: Osteoklasten Ti-O₂ nach 12 Wochen



Abbildung 19: Osteoklasten PS-Ti nach 12 Wochen

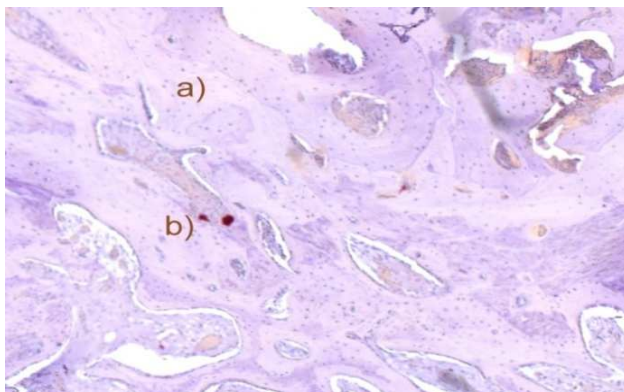


Abbildung 20: Osteoklasten APC nach 12 Wochen

Abbildungen 18-20: Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte histologischer Präparate der Schichtdicke 4 μm in einer zehnfachen Mikroskopvergrößerung in der TRAP-Färbung zum Zeitpunkt 12 Wochen nach Implantation der Spondylodesecages. Rot gefärbt und mit dem Buchstaben b) bezeichnet sind Osteoklasten (die Pfeile bezeichnen Beispiele, nicht zwangsläufig alle im Bild enthaltenen Osteoklasten), Knochenstrukturen sind mit dem Buchstaben a) bezeichnet. Diese repräsentativen Ausschnitte zeigen einen Unterschied in den Quantitäten der Auswertungsgruppen mit den verschiedenen Materialien untereinander. In der Ti-O_2 -Gruppe sind mehr Osteoklasten vorhanden als in der PS-Ti-Gruppe, in dieser sind wiederum mehr Osteoklasten zu erkennen, als in der APC-Gruppe. Diese Unterschiede sind statistisch jedoch nicht signifikant.

Die Betrachtung der Osteoklastenanzahl pro mm^2 Knochenfläche bezüglich der Unterschiede der kranialen zu den kaudalen Segmenten zeigte eindeutig keinen Unterschied in den absoluten Quantitäten auf, was grafisch eindrücklich durch die nahezu identischen Säulendiagramme dargestellt ist (siehe Abbildung 22). Bei der statistischen Analyse wurde dem entsprechend auch kein signifikanter Wert ermittelt, weder bei der Berechnung mittels linearer Regression ($p = 0,492$, R-Quadrat = 0,008), noch bei dem univariante allgemeinen linearen Modell ($p = 0,492$, R-Quadrat = 0,008).

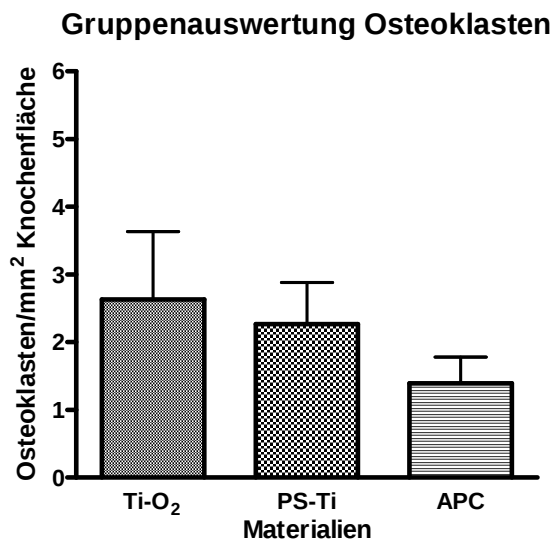


Abbildung 21: Darstellung der Mittelwerte der Osteoklasten/ mm^2 Knochenfläche aller ausgewerteten Präparate getrennt nach Materialien

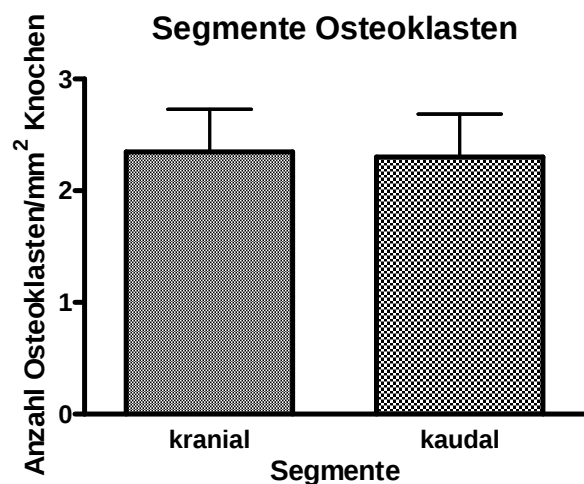


Abbildung 22: Darstellung der Mittelwerte Osteoklasten/ mm^2 Knochenfläche aller ausgewerteten Präparate getrennt nach Segmenten

Es wurde weiterhin eine Betrachtung der Osteoklastenzahlen bezüglich der beiden Zeitpunkte sechs und zwölf Wochen getrennt nach verwendeten Materialien durchgeführt. Hierbei zeigte sich für die Titanoxidgruppe (Ti-O_2) ein Anstieg der Osteoklasten vom Zeitpunkt sechs zum Zeitpunkt zwölf Wochen. In der Plasma-sprayed Titan Gruppe wurde ein leichter Rückgang der Osteoklastenzahl zwischen Auswertungszeitpunkt eins und zwei festgestellt. In der APC-Gruppe schließlich gab es einen leichten Anstieg bei der Osteoklastenzahl pro mm^2 Knochenfläche. Zu bemerken ist, dass in der APC-Gruppe die absolute Anzahl Osteoklasten jederzeit geringer ist als

bei den anderen Gruppen zum gleichen Zeitpunkt (vergleiche Abbildung 23-27). Auch bei diesen Gruppen ergab die lineare Regressionsanalyse der Osteoklasten des kranialen Segmentes wie des kaudalen Segmentes mit der unabhängigen Variable des Auswertungszeitpunktes kein signifikantes Ergebnis (kranial $p = 0,476$, kaudal $p = 0,815$). Die Berechnung des allgemeinen linearen Modells für den Zeitpunkt zeigte ebenfalls keine Signifikanz an (kranial $p = 0,466$, kaudal $p = 0,841$). Die R-Quadrat-Werte entsprechen für beide Modelle den oben genannten.

Die Betrachtung der Osteoklasten pro Quadratmillimeter Knochenfläche in der Subgruppe des Auswertungszeitpunktes zeigt in der APC-Gruppe in der Gegenüberstellung der Vergleichsgruppen zu jedem Zeitpunkt geringere absolute Zahlenwerte, die jedoch den statistischen Berechnungen zufolge nicht signifikant sind.

Vergleich Zeitpunkte Osteoklasten Ti-O₂

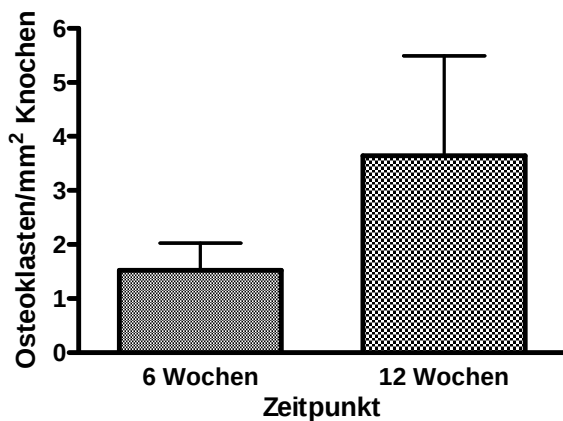


Abbildung 23: Darstellung der Mittelwerte Osteoklasten/mm² Knochenfläche aller ausgewerteten Präparate des Materials Ti-O₂ getrennt nach Auswertungszeitpunkten

Vergleich Zeitpunkte Osteoklasten PS-Ti

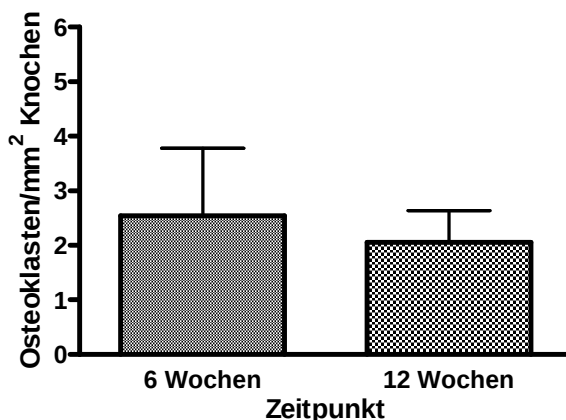


Abbildung 24: Darstellung der Mittelwerte Osteoklasten/mm² Knochenfläche aller ausgewerteten Präparate des Materials PS-Ti getrennt nach Auswertungszeitpunkten

Vergleich Zeitpunkte Osteoklasten APC

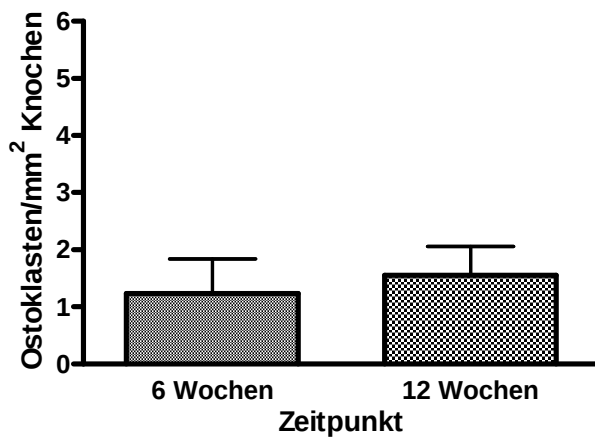


Abbildung 25: Darstellung der Mittelwerte Osteoklasten/mm² Knochenfläche aller ausgewerteten Präparate des Materials APC getrennt nach Auswertungszeitpunkten

Gruppenvergleich Osteoklasten Zeitpunkt 6 Wochen

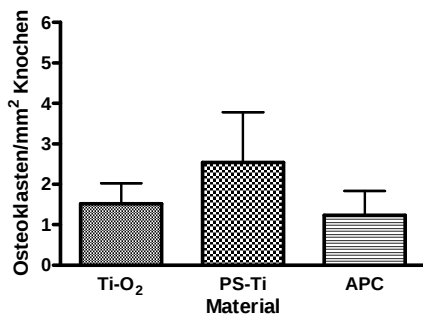


Abbildung 26: Darstellung der Mittelwerte Osteoklasten/mm² Knochenfläche aller ausgewerteten Präparate zum Auswertungszeitpunkt 6 Wochen getrennt nach Materialien

Gruppenvergleich Osteoklasten Zeitpunkt 12 Wochen

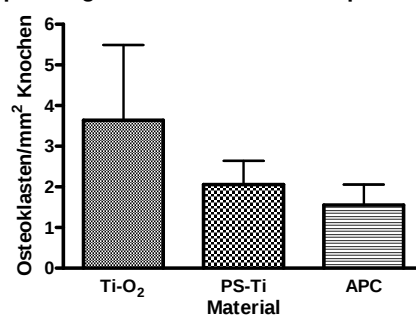


Abbildung 27: Darstellung der Mittelwerte Osteoklasten/mm² Knochenfläche aller ausgewerteten Präparate zum Auswertungszeitpunkt 12 Wochen getrennt nach Materialien

Die gegenseitige Beeinflussung von Gruppe ($\triangleq$ Material) und Zeitpunkt berechnet mit dem univarianten allgemeinen linearen Modell war ebenfalls nicht signifikant (kranial $p = 0,650$, kaudal $p = 0,728$).

Die Auswertung der Osteoklastenanzahl pro mm² Knochenfläche ist in Tabelle 2 und 3 noch einmal zusammenfassend dargestellt, die Einzelauswertung in absoluten Zahlen findet sich im Anhang.

Tabelle 2: durchschnittliche Osteoklastenzahl/mm² Knochen (in Klammern: Standardabweichung)

	Titanoxid	plasma-sprayed-titanium	APC
Gesamtanzahl	2,6 (4,5)	2,3 (2,9)	1,4 (1,7)
Zeitpunkt 6 Wochen	1,5 (1,5)	2,5 (3,7)	1,2 (1,8)
Zeitpunkt 12 Wochen	3,6 (5,8)	2,0 (2,0)	1,6 (1,5)
kraniale Segmente	3,2 (5,5)	1,9 (3,1)	2,0 (1,9)
kaudale Segmente	1,9 (2,9)	2,6 (2,6)	0,8 (1,2)

Tabelle 3: Zusammenfassung der statistischen Auswertung Osteoklasten/mm² Knochenfläche

lineare Regression			ANOVA		
	P-Wert	R-Quadrat		P-Wert	R-Quadrat
kranial		0,034	kranial	0,822	0,074
Gruppe	0,463		Gruppe	0,745	
Zeitpunkt	0,476		Zeitpunkt	0,466	
			Gruppe * Zeitpunkt	0,650	
kaudal		0,036	kaudal	0,678	0,112
Gruppe	0,347		Gruppe	0,298	
Zeitpunkt	0,815		Zeitpunkt	0,849	
			Gruppe * Zeitpunkt	0,728	

3.5.4 Intraindividuelle Varianz Anzahl Gefäße

Insgesamt ist die Verteilung der absoluten Gefäßzahlen über alle Studientiere hinweg als homogen anzusehen (vergleiche Abbildung 28). Einige wenige größere Varianzen stellen sich jedoch auch hier dar. Wie jedoch schon bei den Osteoklastenzahlen konnte auch für die abweichenden Gefäßzahlen keine Ursache gefunden werden. Der Grund für die Abweichung bleibt wiederum unklar.

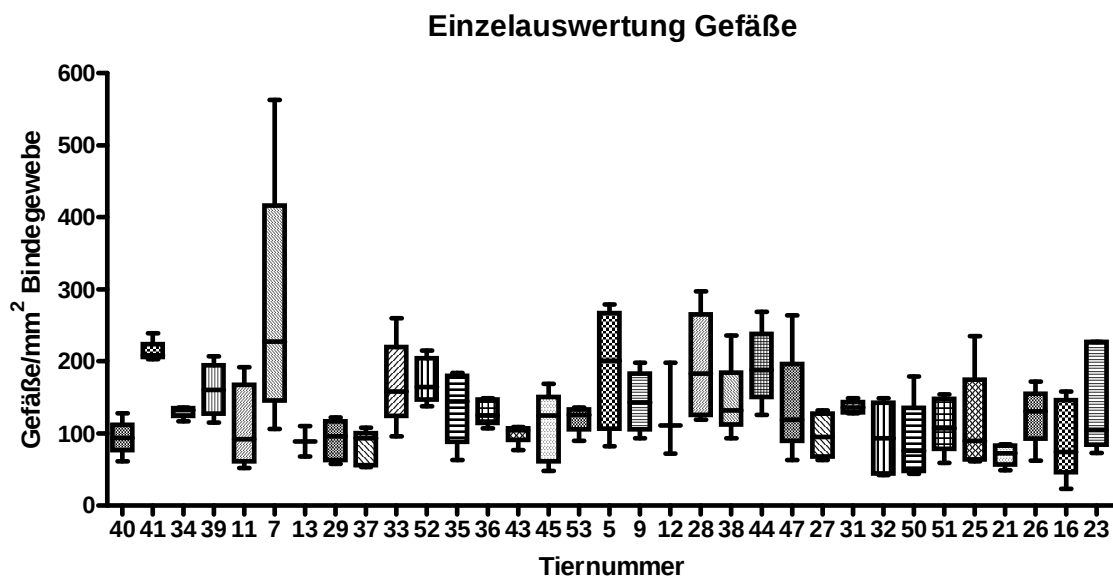


Abbildung 28: Darstellung der absoluten Gefäßanzahl für jedes einzelne Tier (Daten jeweils zusammengesetzt aus mehreren Objektträgern)

3.5.5 Intraindividuelle Varianz der Bindegewebsfläche

Wie schon bei der Knochenfläche, wurde auch bei der Erfassung der innerhalb der ROI enthaltenen Bindegewebsfläche eine deutlich größere Heterogenität der absoluten Zahlenwerte festgestellt, als dies für die Gefäße der Fall war. Die Abweichung der Bindegewebsfläche bezüglich der gesamten Studienpopulation war nur in einem Fall identisch mit der Abweichung der Bindegewebsfläche (Tier Nummer 7). En Gros über alle ausgewerteten Tiere gesehen sind auch die Bindegewebsflächen als homogen zu bezeichnen (vergleiche Abbildung 29).

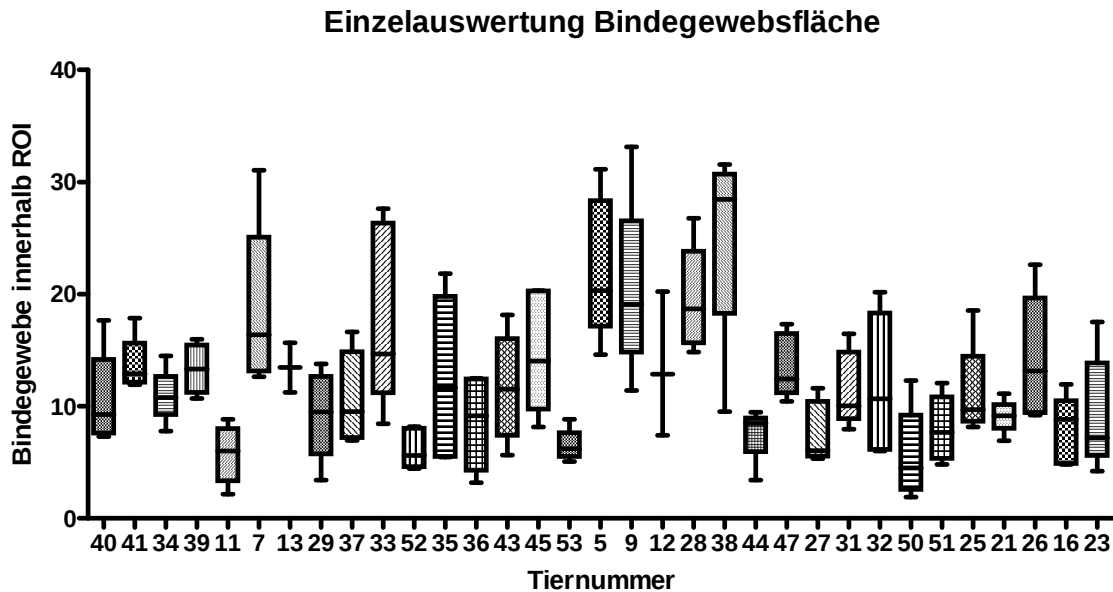


Abbildung 29: Darstellung der absoluten Bindegewebsfläche für jedes einzelne Tier (Daten jeweils zusammengesetzt aus mehreren Objektträgern)

3.5.6 Auswertung Gefäße pro Bindegewebsfläche

Die Aufschlüsselung der Gefäßanzahl pro mm^2 Bindegewebsfläche nach den verwendeten Materialien zeigte keine eindeutig geringere Anzahl der Absolutwerte von Gefäßen bei den APC-Implantatgruppen im Vergleich zu den Ti-O₂- und PS-Ti-Implantatgruppen (kranial 11,4 (APC) gegenüber 14,9 (Ti-O₂) bzw. 12,1 (PS-Ti); kaudal 13,1 (APC) gegenüber 13,5 (Ti-O₂) bzw. 13,2 (PS-Ti) Gefäße pro mm^2 absolut; vergleiche Abbildung 36 und Tabelle 4). Wohl aber lässt sich aufgrund der geringeren Standardabweichungen (APC 3,3/4,3, Ti-O₂ 7,5/5,7, PS-Ti 6,2/6,7 jeweils kraniales/kaudales Segment; siehe auch Tabelle 4) feststellen, dass die absoluten Zahlenwerte in der APC-Gruppe einer geringeren Streuung unterliegen, als dies bei den anderen beiden Materialien der Fall ist. Die statistische Auswertung mittels linearer Regressionsanalyse für die abhängige Variable Gefäße pro mm^2 Bindegewebsfläche konnte, wie aus den Absolutwerten bereits erwartet keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigen. Beim kranialen Segment ergab sich ein Wert von $p = 0,193$, beim kaudalen Segment ein P-Wert von $p = 0,879$. Das univariante allgemeine lineare Modell für die Gefäße berechnet, zeigte weder für das kraniale noch für das kaudale Segment des gesamten Modells signifikante Werte ($p = 0,715$ kraniales Segment bzw. $p = 0,920$ kaudales Segment). Innerhalb der Werte wiederholt sich das Ergebnis der linearen Regression, bei dem für das kraniale Segment ein nicht signifikanter Wert gefunden wurde (kranial $p = 0,449$, kaudal $p = 0,986$). Der R-

Quadrat-Wert der linearen Regressionsanalyse liegt bei 0,078 für das kraniale Segment und 0,019 für das kaudale Segment, die R-Quadrat-Werte für das allgemeine lineare Modell getrennt für kraniales und kaudales Segment waren $p = 0,097$ bzw. $p = 0,053$.

Nach der Betrachtung der Gefäße pro Quadratmillimeter Bindegewebsfläche getrennt nach den verwendeten Materialien kann gesagt werden, dass in der APC-Gruppe die geringste absolute Anzahl Gefäße pro mm^2 Bindegewebsfläche und die geringste Streuung der Absolutwerte vorhanden ist. Dieses Ergebnis erreicht jedoch ebenfalls in keiner der durchgeführten Berechnungen ein statistisches Signifikanzniveau.

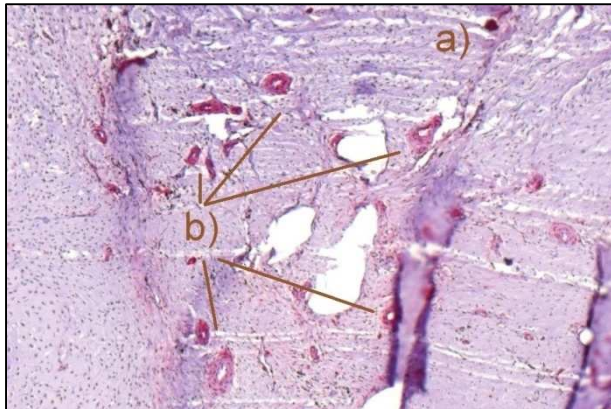


Abbildung 30: Gefäße Ti-O₂ nach 6 Wochen

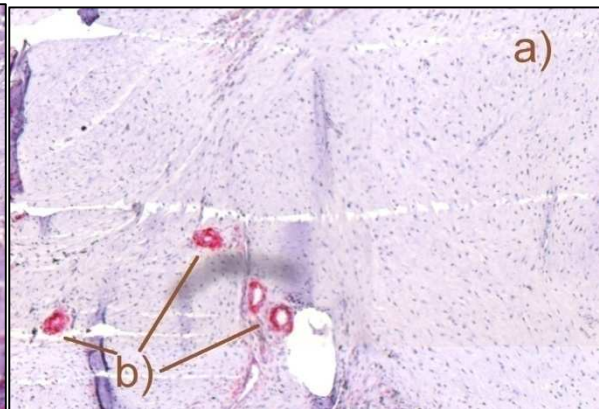


Abbildung 31: Gefäße PS-Ti nach 6 Wochen



Abbildung 32: Gefäße APC nach 6 Wochen

Abbildungen 30-32: Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte histologischer Präparate der Schichtdicke 4 μm in einer zehnfachen Mikroskopvergrößerung in der Färbung des α -glattmuskulären Aktins zum Zeitpunkt 6 Wochen nach Implantation der Spondylodesecages. Rot gefärbt und mit dem Buchstaben b) bezeichnet sind Gefäße (die Pfeile bezeichnen Beispiele, nicht zwangsläufig alle im Bild enthaltenen Gefäße), Knochenstrukturen sind mit dem Buchstaben a) bezeichnet. Diese repräsentativen Ausschnitte zeigen einen geringen Unterschied in den Quantitäten der Auswertungsgruppen mit den verschiedenen Materialien untereinander. In der Ti-O₂-Gruppe sind etwas mehr Gefäße vorhanden als in den anderen beiden Auswertungsgruppen, zwischen der PS-Ti-Gruppe und der APC-Gruppe besteht kaum ein Unterschied. Diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

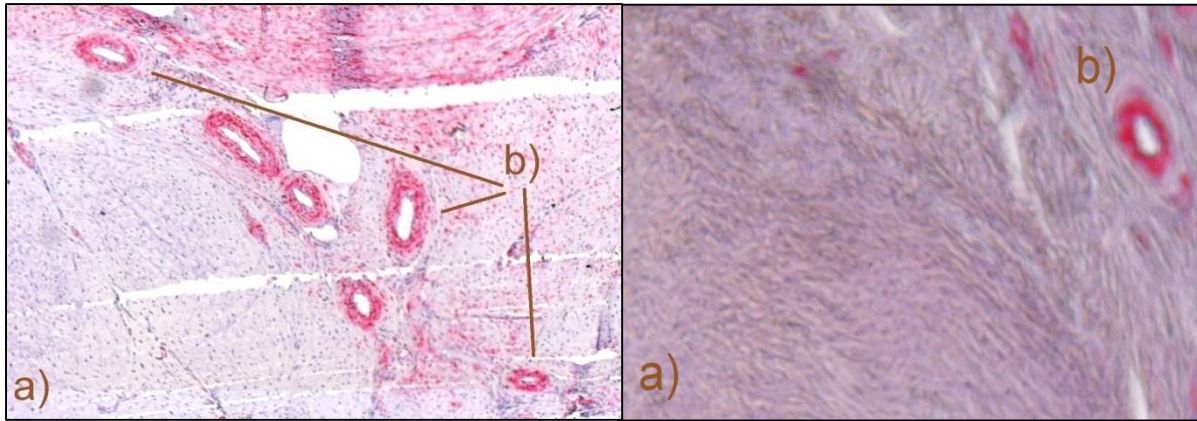
Abbildung 33: Gefäße Ti-O₂ nach 12 Wochen

Abbildung 34: Gefäße PS-Ti nach 12 Wochen

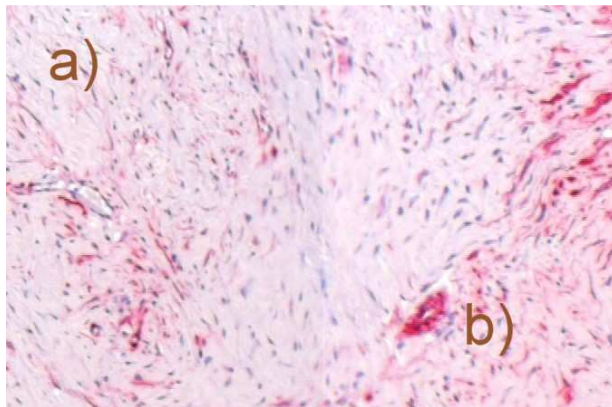


Abbildung 35: Gefäße APC nach 12 Wochen

Abbildungen 33-35: Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte histologischer Präparate der Schichtdicke 4 μm in einer zehnfachen Mikroskopvergrößerung in der Färbung des α -glattmuskulären Aktins zum Zeitpunkt 12 Wochen nach Implantation der Spondylodesecages. Rot gefärbt und mit dem Buchstaben b) bezeichnet sind Gefäße (die Pfeile bezeichnen Beispiele, nicht zwangsläufig alle im Bild enthaltenen Gefäße), Knochenstrukturen sind mit dem Buchstaben a) bezeichnet. Diese repräsentativen Ausschnitte zeigen einen Unterschied in den Quantitäten der Auswertungsgruppen mit den verschiedenen Materialien untereinander. In der Ti-O₂-Gruppe sind mehr Gefäße vorhanden als in der PS-Ti-Gruppe, in dieser sind wiederum geringfügig mehr Gefäße zu erkennen, als in der APC-Gruppe. Diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

Die Betrachtung der Gefäßanzahl pro mm^2 Bindegewebsfläche hinsichtlich der Unterschiede der kranialen zu den kaudalen Segmenten zeigte wie schon für die Osteoklasten dargestellt auch für die Gefäße eindeutig keinen Unterschied zwischen kranialem und kaudalem Segment (siehe Abbildung 37). Die Berechnung der linearen Regression und des allgemeinen linearen Modells mit den Gefäßen als abhängige Variable der unabhängigen Variable Segmente zeigte deutlich keine Signifikanz an (für beide Modelle $p = 0,762$, R-Quadrat = 0,001).

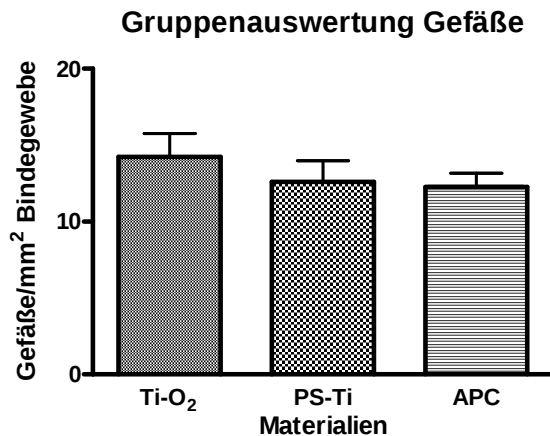


Abbildung 36: Darstellung der Mittelwerte der Gefäße/mm² Bindegewebsfläche aller ausgewerteten Präparate getrennt nach Materialien

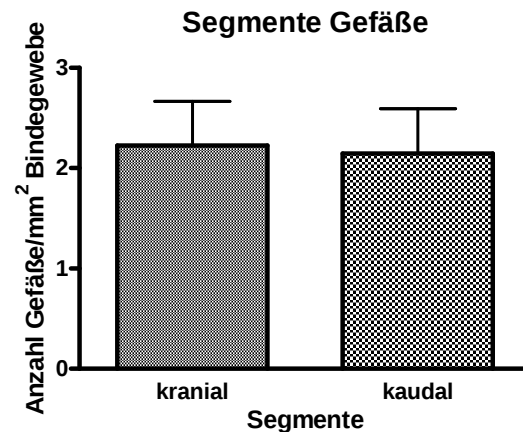


Abbildung 37: Darstellung der Mittelwerte Gefäße/mm² Bindegewebsfläche aller ausgewerteten Präparate getrennt nach Segmenten

Weiterhin wurde die Betrachtung der Gefäßzahlen bezüglich der beiden Auswertungszeitpunkte sechs und zwölf Wochen durchgeführt. Hierbei zeigte sich für alle Gruppen ein Rückgang der Gefäßzahlen pro mm² Bindegewebe vom Zeitpunkt sechs zum Zeitpunkt zwölf Wochen (vergleiche Abbildung 38-42). Während in der Titanoxid-Gruppe und der Plasma-sprayed Titan Gruppe der Rückgang der Gefäßzahlen zwischen Auswertungszeitpunkt eins und zwei mit einer Vergrößerung der Streuung der absoluten Zahlenwerte einherging (Standardabweichungen kranial/kaudal Ti-O₂ 4,4/8,3, PS-Ti 4,9/7,3; siehe auch Tabelle 4), war dies beim APC nicht der Fall (Standardabweichung kranial/kaudal 3,9/3,4; siehe auch Tabelle 4). Statistisch signifikant sind auch die Berechnungen für die Auswertungszeitpunkte der Gefäße pro mm² nicht. Bei der linearen Regressionsanalyse ergeben sich für das kraniale Segment ein P-Wert von 0,365 und für das kaudale Segment ein P-Wert von 0,472. Das allgemeine lineare Modell ergab bei der Berechnung für die Zeitpunkte ebenfalls kein signifikantes Ergebnis (kranial p = 0,417, kaudal p = 0,476). Die R-Quadrat-Werte entsprechen für beide Modelle den bei der Materialauswertung genannten Werten.

Die Betrachtung der Gefäße pro Quadratmillimeter Bindegewebsfläche in der Subgruppe des Auswertungszeitpunktes zeigt in der APC-Gruppe in Gegenüberstellung zu den Vergleichsgruppen zu jedem Zeitpunkt geringere absolute Zahlenwerte und geringere Streuung der Absolutwerte, die jedoch den statistischen Berechnungen nach nicht signifikant sind.

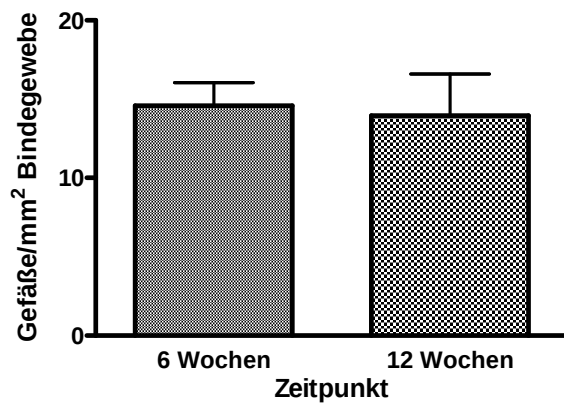
Vergleich Zeitpunkte Gefäße Ti-O₂

Abbildung 38: Darstellung der Mittelwerte Gefäße/mm² Bindegewebsfläche aller ausgewerteten Präparate des Materials Ti-O₂ getrennt nach Auswertungszeitpunkten.

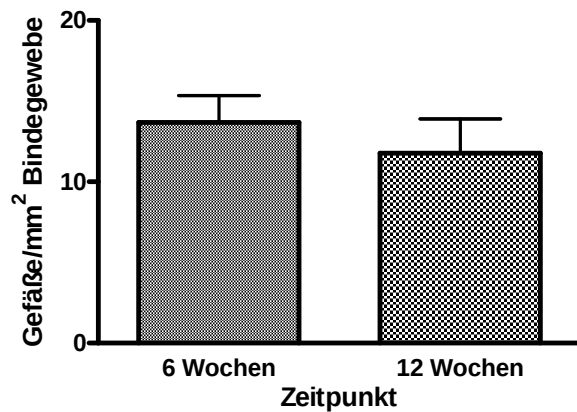
Vergleich Zeitpunkte Gefäße PS-Ti

Abbildung 39: Darstellung der Mittelwerte Gefäße/mm² Bindegewebsfläche aller ausgewerteten Präparate des Materials PS-Ti getrennt nach Auswertungszeitpunkten.

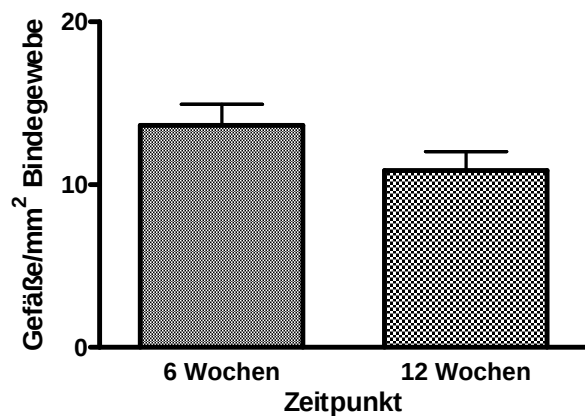
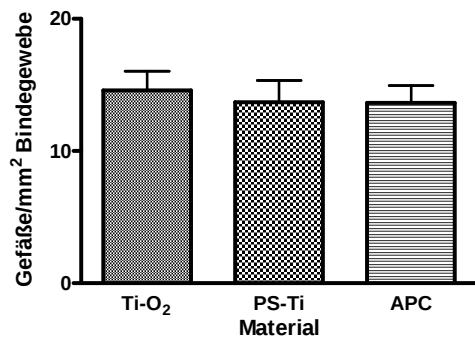
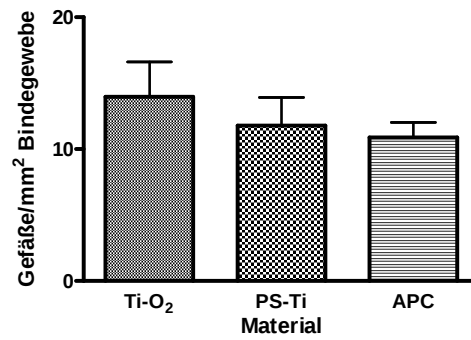
Vergleich Zeitpunkte Gefäße APC

Abbildung 40: Darstellung der Mittelwerte Gefäße/mm² Bindegewebsfläche aller ausgewerteten Präparate des Materials APC getrennt nach Auswertungszeitpunkten.

Gruppenvergleich Gefäße Zeitpunkt 6 Wochen

Abbildung 41: Darstellung der Mittelwerte Gefäße/mm² Bindegewebsfläche aller ausgewerteten Präparate zum Auswertungszeitpunkt 6 Wochen getrennt nach Materialien

Gruppenvergleich Gefäße Zeitpunkt 12 Wochen

Abbildung 42: Darstellung der Mittelwerte Gefäße/mm² Bindegewebsfläche aller ausgewerteten Präparate zum Auswertungszeitpunkt 12 Wochen getrennt nach Materialien

Die gegenseitige Beeinflussung von Gruppe ($\triangleq$ Material) und Zeitpunkt berechnet mit dem univarianten allgemeinen linearen Modell war ebenfalls nicht signifikant (kranial $p = 0,811$, kaudal $p = 0,650$).

Die Auswertung der Gefäße pro mm² Bindegewebsfläche ist in Tabelle 4 und 5 noch einmal zusammenfassend dargestellt. Die Auflistung der Einzelwerte befindet sich auch für diese Parameter in Tabelle 8 im Anhang.

Tabelle 4: durchschnittliche Gefäße/mm² Bindegewebsfläche (in Klammern: Standardabweichung)

	Titanoxid	plasma-sprayed-titanium	APC
Gesamtanzahl	14,3 (6,8)	12,6 (6,5)	12,3 (3,9)
Zeitpunkt 6 Wochen	14,6 (4,4)	13,9 (4,9)	13,6 (3,9)
Zeitpunkt 12 Wochen	14,0 (8,3)	11,8 (7,3)	10,8 (3,4)
kraniale Segmente	14,9 (7,5)	12,1 (6,2)	11,4 (3,3)
kaudale Segmente	13,5 (5,7)	13,2 (6,7)	13,1 (4,3)

Tabelle 5: Zusammenfassung der statistischen Auswertung Gefäße/mm² Bindegewebsfläche

lineare Regression			ANOVA		
	P-Wert	R-Quadrat		P-Wert	R-Quadrat
kranial		0,078	kranial	0,751	0,097
Gruppe	0,193		Gruppe	0,449	
Zeitpunkt	0,365		Zeitpunkt	0,417	
			Gruppe * Zeit- punkt	0,811	
kaudal		0,019	kaudal	0,920	0,053
Gruppe	0,879		Gruppe	0,986	
Zeitpunkt	0,472		Zeitpunkt	0,476	
			Gruppe * Zeit- punkt	0,650	

Insgesamt zeigen die statistischen Berechnungen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Berechnung für die Segmente ergab ebenfalls in keinem der gerechneten Modelle signifikante Unterschiede (vergleiche Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Segmente getrennt nach Osteoklasten und Gefäßen pro mm² Bezugsfläche

Segmente		
	P-Wert	R-Quadrat
Osteoklasten	0,492	0,008
Gefäße	0,762	0,001

4 Diskussion

Den zuvor genannten Ergebnissen folgend ergibt sich also insgesamt für keine der ausgewerteten Untergruppen ein statistisch signifikanter Unterschied. Für die Interpretation dieser Ergebnisse ist die Betrachtung der verwendeten Materialien und Methoden sowie der Teilergebnisse der einzelnen Untersuchungen und deren Bewertung im speziellen und im Gesamtkontext wesentlich.

Bereits zu Beginn der Arbeit, im klinischen Teil der Studie traten unvorhersehbare Ereignisse auf, die zum Ausscheiden von insgesamt sechs Tieren aus der Studie führten. Narkosekomplikationen, die intraoperative vaskuläre Komplikation und die fulminante Lungenembolie gehören zu den bekannten, bedauerlicherweise immer wieder auftretenden allgemeinen Operationsrisiken. Die operative Komplikationsrate der vorliegenden Studie ist dem oberen normalen Durchschnittsbereich zuzuordnen. Der Grund für die Komplikationen bleibt unklar. Dieses Phänomen könnte auf nicht erkannte Einflüsse zurückzuführen sein. Sowohl unbemerkte Einflussfaktoren der Tiere als auch der intra- und postoperativen Verhältnisse oder Kombinationen jener und weiterer Faktoren könnten ursächlich sein. In anderen in-vivo Untersuchungen wurde von einer noch deutlich höheren Komplikationsrate berichtet (9, 91). Auch die Autoren dieser Studien benennen keine Gründe für deren Auftreten.

Direkt nach Narkoseende konnten sich die Tiere uneingeschränkt bewegen, eine Immobilisation wurde nicht durchgeführt, auch nicht einzelner Bewegungsrichtungen. Im weiteren postoperativen Verlauf blieben die Tiere für einige Tage zur Erleichterung der Überwachung in den Stallungen der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité. Im Anschluss an diese wenige Tage dauernde Phase wurden die operierten Tiere in ein Freilaufgehege überführt und verblieben dort bis zum Zeitpunkt ihrer Euthanasie. Der Aufenthalt im Freilaufgehege führte unweigerlich zu einer „Alltagsbelastung“ der Wirbelsäule und damit auch der versteiften Segmente. Dies ist die naheliegendste und wahrscheinlichste Erklärung für die beiden aufgetretenen Komplettluxationen und die subluxierten Implantate. Der Übertragbarkeit auf den Menschen tut dies keinen Abbruch. Im Gegenteil kommt diese Art der Tierhaltung ihr eher entgegen. Die Belastung, der sich die Tiere aussetzten ist für den Menschen in einer vergleichbaren postoperativen Situation als mindestens maximal zu bezeichnen. Trotz dieser hohen Belastung der versteiften Wirbelsäulensegmente kam es nur zu zwei

Komplettluxationen und einigen wenigen quantitativ geringen Subluxationen der Implantate aus der operativ hergestellten Lage heraus. Die Art der Tierhaltung postoperativ, und besonders der Freilandaufenthalt, ist bezüglich der Implantateinheilung sicher zu Recht als „worst-case“-Szenario zu bezeichnen. Die Aussage der Studie bezüglich der klinischen Festigkeit der eingebrachten Implantate könnte daher lauten: Wenn bereits unter postoperativ sofort erfolgter Vollbelastung derart wenige Luxationen auftreten, dann lässt sich die Luxationsrate durch postoperative Schonung für einen gewissen Zeitraum beim Menschen womöglich noch weiter vermindern.

Während der Aufarbeitung der Präparate für die immunhistologische Untersuchung mussten die nach dem Sägevorgang noch enthaltenen Titanimplantate aus den durch Sägen hergestellten Knochenscheiben entfernt werden. Dieses Vorgehen war unverzichtbar, da die Mikrotomklingen derart hartes Material nicht zu Schneiden in der Lage sind. Die Entfernung erfolgte sehr vorsichtig und unter maximal möglicher Schonung des angrenzenden Gewebes. Es ist trotz sehr vorsichtigen Arbeitens dabei grundsätzlich jedoch nicht auszuschließen, dass durch den Vorgang des Entfernens artifizielle Veränderungen am Gewebe verursacht wurden. Diese theoretische Möglichkeit konnte in den mikroskopischen Untersuchungen nicht verifiziert werden. Es gab in keinem mikroskopierten Präparat einen Hinweis auf artifiziell durch das Entfernen des Implantates entstandene Schäden am Gewebe.

Die Einbettung der zu untersuchenden Strukturen in Paraffin nach Separation vom Implantat ist heute die am weitesten verbreitete und am häufigsten genutzte Methode zur immunhistologischen Analyse der Kontaktfläche von Implantat und angrenzendem Gewebe (92). Diese Methode kann als das Standardverfahren gelten. Dennoch ist nicht sicher, dass durch diese Technik die komplette Oberfläche in den mikroskopisch untersuchten Präparaten abgebildet ist. Neben oben beschriebener geringer jedoch vorhandener Unsicherheit bei der Entfernung des Implantates kann es auch beim Schneiden am Mikrotom, beim Aufziehen auf den Objektträger und Trocknen des Präparates, während der Lagerung und des gesamten Färbeprozesses bis zum Eindecken des gefärbten Präparates zum unbeabsichtigten und unbemerkten Verlust von Gewebekomponenten kommen. Dieser etwaige Verlust könnte bei jedem Präparat von unterschiedlichem Ausmaß sein. Für zukünftige Studien mit ähnlicher Zielsetzung wie in vorliegender Untersuchung (Charakterisierung der Kontaktfläche zwischen Implantat und angrenzendem Gewebe) sollte die Verwendung der Technik zur

Aufarbeitung der Präparate, wie sie von Lindner beschrieben wurde in Erwägung gezogen werden (92). Diese Technik verspricht eine verlässliche Alternative zu den bisher verwendeten Techniken zu sein, zumal sie ohne Modifikationen am Präparat vornehmen zu müssen eine Untersuchung durch jede Art von Mikroskopie ermöglichen soll.

Die Entscheidung zur Wahl der ROI in der Art, wie sie in der vorliegenden Studie verwendet wurde orientierte sich an bereits veröffentlichten Untersuchungen mit ähnlicher Zielsetzung. In vielen der Entscheidung zugrunde liegenden Studien wurden nur wenige Ausschnitte der Kontaktfläche untersucht. Der Grund dafür war entweder die Verwendung ultrastruktureller Untersuchungstechniken (19, 22, 28, 32, 71, 78) oder die bewusste, willkürliche Verwendung von einigen wenigen, mehr oder minder repräsentativen mikroskopischen Bildausschnitten (36, 42). In anderen Veröffentlichungen wurde zur Erstellung der ROI keine Aussage getroffen (5, 44, 88). Eine Untersuchung verwendete eine komplizierte Formel, welche sehr individuelle Parameter jedes einzelnen mikroskopierte Präparates nutzte (66). Vorliegende Studie orientierte sich an der Studie von Zou et al. (93). In dieser Untersuchung wurde eine ROI im Abstand von zwei Millimeter um die Grenzfläche gezogen. Die Wahl der ROI auf diese Weise ermöglicht die Charakterisierung der gesamten Zirkumferenz der Kontaktfläche von Implantat und angrenzendem Gewebe. Dies war in den anderen Studien mit den dort verwendeten Definitionen der ROI nicht möglich. Da in den hier verwendeten Präparaten im Gegensatz zu der zugrunde liegenden Studie ein recht großes solides Implantat verwendet wurde hätten zwei Millimeter Abstand eine kaum mehr auswertbar große Fläche ergeben. Die Entscheidung wurde schließlich dahingehend getroffen, die ROI für alle Präparate auf einen Millimeter festzusetzen. Diese Abweichung von der Ausgangsstudie stellt darüber hinaus eine Präzisierung für die Aussage der vorliegenden Arbeit dar. Der Grund dafür liegt in den getesteten Materialien und Oberflächen. In der vorliegenden Studie wurden in Gewebe nicht gut diffundierende Stoffe verwendet. Eine Änderung des Milieus über einen Millimeter vom Implantat entfernt muss daher als nicht durch das Implantat verursacht gelten. Die Erfassung dieser Veränderungen würde zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen.

Die für die Auswertung verwendete Definition der Osteoklasten orientiert sich an den anatomischen und funktionellen Spezialitäten dieser Zellen in Abgrenzung zu anderen Zellen (94). Durch die in der vorliegenden Arbeit verwendete Definition kann das

versehentliche Einbeziehen anderer Zellen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die Darstellung der Gefäße mit dem monoklonalen Antikörper gegen die Alpha-Untereinheit des glattmuskulären Aktins ist eine weit verbreitete und anerkannte Methode für diesen Zweck (95). Problematisch war in der vorliegenden Studie die Mitfärbung der Myofibrozyten/-blasten, durch die eine exakte Zählung der Gefäße erschwert wurde. Durch die genaue Einhaltung der oben genannten Definition, sehr konzentriertes Arbeiten und unter Zuhilfenahme der digitalen Technik wurde das versehentliche Übersehen von Gefäßen oder versehentliches Werten von Myofibroblasten als Gefäße so gut als möglich vermieden. Dennoch ist für weitere Studien zu erwägen eine noch selektivere Färbemethode für Gefäße einzusetzen. Dies könnte eine problemlosere und einfachere Auswertung möglich machen. Aufgrund der während der Studie gewonnen Erkenntnisse böte sich die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen den Endothelfaktor VIII an. Zum Zeitpunkt des Verfassens vorliegender Arbeit ist dem Autor nicht bekannt, dass es vergleichende Untersuchungen zwischen beiden Färbemethoden gäbe. Ein signifikanter Unterschied in dem Ergebnis der Auszählung ist bei exaktem Arbeiten jedoch nicht zu erwarten. Sehr wohl kann aber die aufzuwendende Anstrengung minimiert werden. Eine bisher noch nicht durchgeführte vergleichende Studie der beiden Antikörper könnte diese Hypothese bestätigen. Die Durchführung einer solchen vergleichenden Untersuchung könnte und sollte durchaus für die nähere Zukunft geplant werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Färbung des α -SMA verwendet, um die Vergleichbarkeit mit bereits durchgeführten Untersuchungen zu ermöglichen. In den bisher veröffentlichten Studien wurde mehrheitlich dieser Antikörper verwendet.

Durch die Verwendung der digitalen Bildverarbeitungssoftware und die Berechnung der Flächen bis auf die sechste Nachkommastelle kann die Genauigkeit der Bezugsflächen Knochen und Bindegewebe derzeit nicht übertroffen werden. Aufgrund der stets gleichfarbigen Markierung aller, dem speziellen Gewebe entsprechenden Flächen und anschließende Summation aller gleich eingefärbten Flächen bis auf die sechste Nachkommastelle durch das Programm, ergeben sich extrem genaue Messungen. Die Verwendung der gesamten erhaltenen Zahlenwerte inklusive aller sechs Nachkommastellen für weitere Rechenoperationen und erst am Ende stattfindendes Runden erhalten die Genauigkeit der Messung bis zum Schluss.

Die statistische Analyse der beiden für die Spondylodese verwendeten Segmente eines Tieres zeigte keine signifikanten Unterschiede der Oberflächentypen bezüglich der ausgewerteten Parameter Osteoklasten und Neovaskularisation. Eine theoretisch anzunehmende gegenseitige Beeinflussung durch die nahe beieinander liegenden Spondylodesen wird durch dieses Ergebnis falsifiziert. In der vorliegenden Untersuchung wurde soweit den Mitgliedern des Forschungsteams bekannt ist zum ersten Mal der Versuch unternommen bei einem Tier zwei Bewegungssegmente der Lendenwirbelsäule zu versteifen. Dieses Vorgehen wurde bei unserer Studie bewusst gewählt, um die Anzahl der für die Untersuchung zu tötenden Tiere minimieren zu können. Offensichtlich führte diese Methode zu keiner Beeinflussung der Ergebnisse, was durch die statistische Analyse eindeutig belegt wird. Gleiches oder ähnliches Vorgehen ist daher für weitere Studien als praktikabel und oben genannter Argumentation folgend als sinnvoll anzusehen.

Auch wenn die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht statistisch signifikant sind, so kann doch festgestellt werden, dass in der Gruppe der APC-behandelten Implantate weniger Neovaskularisation auftritt. Diese Aussage stützt sich auf die geringeren absoluten Zahlenwerte und die geringere Standardabweichung bei den errechneten Mittelwerten. Die geringere Standardabweichung bei insgesamt ähnlichen Mittelwerten legt nahe, dass gleichmäßig wenige Gefäße vorhanden sind. Die Einzelwerte unterliegen also einer geringeren Streuung. Damit ist die Wahrscheinlichkeit eine verstärkte Entzündungsreaktion vorzufinden geringer als bei stärker streuenden Werten. Die Neovaskularisation gilt als Marker für aseptische Entzündungen, folglich gibt es in der APC-Gruppe den vorliegenden Ergebnissen nach sehr wahrscheinlich weniger Entzündungsreaktionen.

Eine ähnliche Aussage kann auch für die osteolytische Tätigkeit getroffen werden. Geringere absolute Zahlenwerte und eine geringere Standardabweichung bei ähnlichen Mittelwerten legt auch für diesen Parameter nahe, dass die Wahrscheinlichkeit verstärkte Osteolysen vorzufinden geringer ist. Die Verwendung der Osteoklasten als Marker für Osteolysen führt damit zu der Aussage, dass scheinbar weniger Knochenabbau in der APC-Gruppe auftritt.

Bei der Betrachtung der beiden Auswertungszeitpunkte für den Parameter der Neovaskularisation fällt auf, dass nach sechs Wochen die Werte für alle drei Materialien

sehr ähnlich sind. Nach zwölf Wochen nahm die Streuung der Werte für die Titanoxidgruppe und die plasma-sprayed Gruppe jedoch noch einmal zu, während sie für die APC-Gruppe nahezu gleich blieb. Hieraus kann man mit gegebener Zurückhaltung folgern, dass der Prozess der Neovaskularisation bei der APC-Gruppe schneller verläuft und nach sechs Wochen offenbar schon auf dem Stand ist, der bei den anderen Gruppen zwölf Wochen entspricht. Nach zwölf Wochen ist der Prozess der Gefäßneubildung in der APC-Gruppe womöglich schon abgeschlossen bzw. hat sich stabilisiert.

Aufgrund des erst kürzlich für die Modifikation von medizinischen Implantaten entdeckten APC-Verfahrens ist die bisherige medizinisch-wissenschaftliche Literatur zu diesem Thema rar. Bisher sind lediglich drei vergleichende Studien veröffentlicht worden. Alle zuvor durchgeführten Studien mit dem Ziel der APC-Testung zeigten vielversprechend positive Ergebnisse. Baxter et al. (60) untersuchten in ihrer in-vitro Studie die positive Zellantwort auf die APC Oberfläche. Sie konnten zeigen, dass sowohl Osteoblasten als auch Fibroblasten besser auf der APC Oberfläche haften konnten, als auf den verglichenen Oberflächen. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Osteoklasten und Entzündungsreaktionen die entgegengesetzten Mechanismen wie in der zitierten Studie untersucht. Die von Baxter et al. in-vitro gefundene sehr gute Zytokompatibilität bezugnehmend auf die bessere Haftung von Blasten auf der APC Oberfläche kann durch die vorliegende Aussage zur Neovaskularisation/Entzündungsreaktion vorbehaltlich genannter statistischer Einschränkungen als bestätigt angesehen werden. Neuhoff et al. (78) fanden nicht nur eine bessere Osteointegration von APC im Gegensatz zu den Vergleichsmaterialien, sondern auch einen geringeren Inflamationsrate in der APC-Gruppe. In dieser Studie wurde die Osteointegration durch Darstellung von Osteoblasten und histomorphometrische Knochensubstanzmessungen evaluiert. Infektionen wurden anhand eines klinischen Scores bewertet. Die Ergebnisse der Arbeit von Neuhoff et al. decken sich, vorbehaltlich bekannter Einschränkungen, mit den grundsätzlichen Aussagen vorliegender Studie. Wir konnten ebenfalls eine bessere Integration repräsentiert durch eine geringere Anzahl Osteolysen und eine geringere Entzündungsreaktion demonstriert durch weniger Neovaskularisation zeigen. In der aktuellsten dieser drei Studien bestätigen Schlegel et al. (79) bei Ihrer in-vivo Vergleichsstudie die gute Biokompatibilität des APC Materials wiederum durch histomorphometrische Untersuchungen. Wie schon zuvor beschrieben deckt sich diese Aussage mit den Ergebnis-

sen unserer Studie. Schlegel et al. konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen nachweisen, jedoch kommen die zu dem Ergebnis der besseren Oberflächenstabilität bei den APC Implantaten, welches durch den subjektiven Eindruck aus der vorliegenden Arbeit bestätigt wird. Die Autoren vertreten die Meinung, dass die APC-Behandlung trotz nicht erreichter Signifikanz ein großes Potenzial birgt, explizit wird auf die Verwendung bei Spondylodesecages hingewiesen. Aufgrund der hier vorgelegten Ergebnisse kann sich der Autor dieser Meinung anschließen. In Zusammenschau aller vorliegenden Ergebnisse scheinen die Vorteile des neuen Materials offenkundig zu sein.

Es konnte bei vorliegendem in-vivo Versuch statistisch kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden. Dennoch zeigen die statistischen Berechnungen keine Nachteile der APC-Beschichtung gegenüber den Vergleichsmaterialien. Die gute Biokompatibilität ist durch die vorliegende und weitere Studien gut belegt. Darüber hinaus bietet das APC-Herstellungsverfahren neben einer einfachen und kostengünstigen Herstellung weitere Vorteile. So kann dieses Verfahren bei jeder Art von komplex strukturiertem Material angewendet werden, ohne dass durch die Behandlung die äußere Form verändert wird. Weiterhin sind die APC-behandelten Materialien sofort nach der Behandlung sauber, das heißt frei von Debris, und steril. Ein Reinigungsschritt im Herstellungsprozess entfällt damit. Die vorliegende Studie kann als weiterer Baustein in der Reihe von Testungen dieses neuen Materials angesehen werden. Aufgrund der gesamten vorliegenden Studienergebnisse zu diesem Material, kann von einem vorteilhaften Gesamtergebnis gesprochen werden.

Für die erstmals erfolgte Versteifung von zwei Bewegungssegmenten eines Wirbelsäulenabschnitts bei einem Versuchstier konnte eine wechselseitige Beeinflussung statistisch nicht bewiesen werden. Ein solches Vorgehen kann damit als gerechtfertigt betrachtet werden und ist unter dem Gesichtspunkt der Minimierung von zu tödenden Tieren als ethisch sehr wertvoll zu erachten.

Aufgrund der soeben dargelegten Ergebnisse muss geschlussfolgert werden, dass die Arbeitshypothese als nicht zutreffend verworfen werden muss, ein statistisch signifikanter Vorteil der APC-behandelten Implantate ist nicht nachzuweisen. Es gilt die Nullhypothese. Gleiches ist für die Hypothese bezüglich der Zeitpunkte der Fall: Statistisch lässt sich ein signifikanter Unterschied nicht beweisen, auch hier gilt die Nullhypothese.

5 Zusammenfassung

Prothesenlockerungen, insbesondere aseptische, sind ein bislang ungelöstes Problem in der modernen Endoprothetik. Die bisherige medizinisch-wissenschaftliche Forschung auf diesem Gebiet konnte eine verbesserte Osteointegration durch diverse unterschiedliche Oberflächenmodifikationen zeigen. Leider offenbaren alle bisherigen Modifikationsverfahren verschiedene Nachteile. Besonders die schwache Oberflächenstärke der Beschichtungen schränkt deren Verwendung massiv ein. Anodic-plasma-chemical (APC) Behandlung ermöglicht die Herstellung von Implantaten, bei denen Kalziumphosphat direkt in eine metallische Oberfläche inkorporiert ist. Durch diese Behandlung erhält man eine wesentlich bessere Oberflächenstärke als mit bisher verwendeten Modifikationsmethoden. Zusätzlich führt die bioaktive Metalloberfläche zu einer verbesserten Osteointegration. Da die gute Zytokompatibilität bereits durch in-vitro Versuche bestätigt worden ist wurde diese Studie mit der Zielsetzung durchgeführt, die Zytokompatibilität (wenig Osteolysen und wenig aseptische Entzündungsreaktion) in belasteter Umgebung in einem in-vivo Modell bei lumbaler Spondylodese nachzuweisen. Als Vergleichsmaterialien wurden ein herkömmliches Titanoxid- und ein mit dem Plasma-sprayed-Verfahren behandeltes Titanmaterial verwendet. Die Spondylodeseimplantate wurden in die Lendenwirbelsäulen von weiblichen Merino-Mix Schafen mit einer postoperativen Standzeit von sechs beziehungsweise zwölf Wochen implantiert (zwei Auswertungszeitpunkte). Osteoklasten als Marker für Osteolysen und Neovaskularisation als Marker für Entzündungsreaktionen wurden nach immunhistologischer Färbung quantitativ ausgewertet.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Oberflächenmodifikationen gefunden. Dieses Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass die APC behandelten Implantate eine mindestens ebenso gute Biokompatibilität haben, wie die verwendeten Vergleichsmaterialien. Der aktuellen Studienlage nach ermöglicht das APC-Verfahren eine bisher nicht gekannte bioaktive und dennoch starke Oberfläche in Verbindung mit einer in-vivo nachgewiesenen guten Biokompatibilität, bei vergleichsweise einfacher, schneller und kostengünstiger Herstellung. Aus diesen Gründen scheint das APC-Oberflächenmodifikationsverfahren großes Potenzial für die zukünftige Herstellung von metallischen Implantatmaterialien zu haben.

6 Anhang

6.1 Studiencode

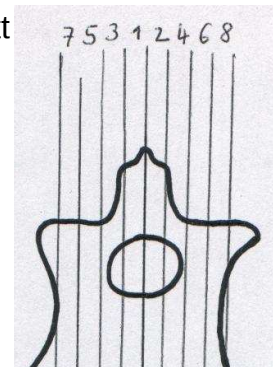
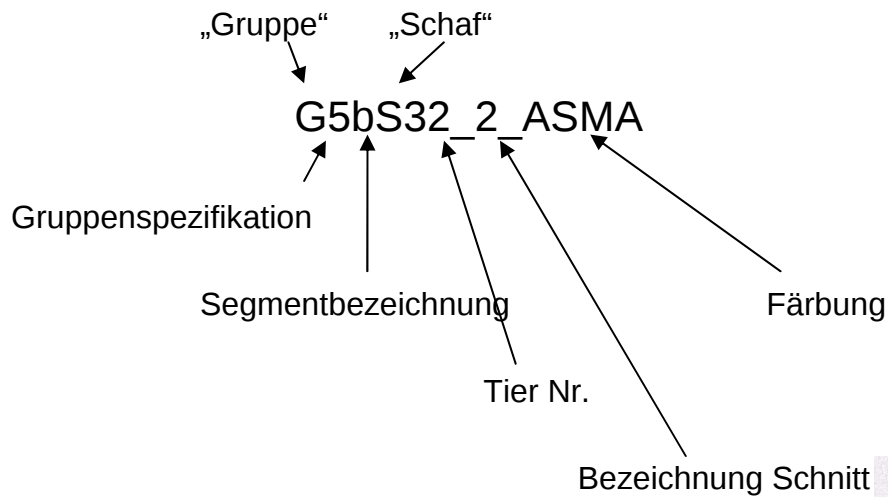


Abbildung. 42: Sägeprotokoll

Gruppenspezifikation:

- G1 = Titanoxid 6 Wochen
- G2 = Titanoxid 12 Wochen
- G3 = Plasma-sprayed-titanium 6 Wochen
- G4 = Plasma-sprayed-titanium 12 Wochen
- G5 = APC 6 Wochen
- G6 = APC 12 Wochen

Segmentbezeichnung:

- a = kraniales Segment
- b = kaudales Segment

Färbungen:

- TRAP = tartrat-resistente alkalische Phosphatase
- ASMA = α -smooth-muscle actin

6.2 Fixierungslösung

Mengenangaben für die Herstellung von 1 Liter Fixierungslösung.

- 324 ml Formaldehydlösung 37 %
- 550 ml Alkohol 100 %
- 130 ml Barbitol-Na-Puffer 0,1 molar, pH 7,3
- 6 g Glukose

Die Reihenfolge der Stoffe ist bei der Herstellung wie oben angegeben einzuhalten. Auf gutes Mischen der Lösung ist nach Zugabe jeder weiteren Komponente zu achten.

Es empfiehlt sich einen magnetischen „Rührfisch“ und eine magnetische Heizplatte zu verwenden, um eine optimale Mischung schon bei der Zugabe jedes weiteren Stoffes zu erreichen. Eine Erwärmung der Platte ist nicht notwendig.

6.3 Entwässerungsprogramm

Der in dieser Studie verwendete Entwässerungsautomat der Firma Leica (TP 1020; siehe Abbildung 43) besteht aus einem Karussell von zwölf mit Flüssigkeiten gefüllten Glasbehältern. An einem mechanischen Arm kann ein Metallkorb befestigt werden, in dem die zu entwässernden Präparate gelagert werden. Vollautomatisch wird der Arm mitsamt des Korbes durch die Prozessoreinheit des Gerätes gesteuert nach der zuvor eingestellten Zeit von einem Behälter in das folgende befördert. Um sicherzustellen, dass jedes Präparat vollständig von der Flüssigkeit, in der sich der Korb aktuell befindet, umgeben ist, führt das Gerät selbstständig in fest vorgegebenen Zeitabständen Bewegungen durch. Dadurch schwimmen die Präparate kurzzeitig frei in der Flüssigkeit innerhalb des Korbes.

Aufgrund der Gewebeeigenschaften der Präparate wurde das Entwässerungsprogramm drei gewählt, was folgende Zeiten beinhaltet:

Entwässerungsprogramm 3:

1. 8 Stunden 70% Alkohol
2. 4 Stunden 80% Alkohol
3. 4 Stunden 80% Alkohol
4. 8 Stunden 96% Alkohol
5. 10 Stunden 96% Alkohol
6. 10 Stunden 100% Alkohol
7. 10 Stunden 100% Alkohol
8. 10 Stunden 100% Alkohol
9. 1 Stunde Xylol
10. 1,5 Stunden Xylol
11. 2,5 Stunden Paraffin
12. 2 Stunden Paraffin

Insgesamt befinden sich die Präparate also für genau 72 Stunden in der Entwässerung.



Abbildung 43: Entwässerungsautomat TP 1020, Fa. Leica

6.4 Färbeprotokolle

6.4.1 TRAP-Färbung (tartrat-resistente saure Phosphatase)

Ausrüstung und Reagenzien

- Xylol (Fa. J.T. Baker, Holland)
- Alkohole in unterschiedlichen Verdünnungen (100%, 96%, 80%, 70%; Fa. Herbeta, Deutschland)
- Aqua dest (Herstellung im Labor durch Milli-Q UF plus; Fa. Millipore, USA)
- Na-Acetat (Fa. Sigma)
- Na-Tartrat-Dihydronat (Fa. Sigma)
- Naphtol AS-MIX Phosphat (Fa. Sigma)
- N-N-Dimethylformamid (Fa. Sigma)
- Fast Red Violett LB Salt (Fa. Sigma)
- Triton X (Fa. Sigma)
- HCl (Fa. Merck, Deutschland)
- NaOH (Fa. Merck, Deutschland)
- Meyer's Hämalun (Fa. Sigma)
- VitroClud[®]-Kleber (Einschlussmittel für mikroskopische Technik; Fa. R. Langenbrinck, Deutschland)
- Waage (Messbereich Mikrogramm; Fa. WTW, Deutschland)
- pH-Meter (Fa. WTW, Deutschland)
- Färbeküvetten
- Färbeschiffchen
- Objektträgerdeckel
- Paraffinschnitte auf Objektträger

Methode

1. Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte durch Einstellen in zwei Xylolbäder für jeweils zehn Minuten, gefolgt von fünf Alkoholbädern in absteigender Reihe (100 %, 100 %, 96 %, 80 %, 70 %) für jeweils zwei Minuten und einem Bad von Aqua dest für 2 Minuten.
2. Herstellung des TRAP-Puffers aus 3,28 g Na-Acetat und 46,01 g Na-Tartrat.
3. Einstellen des pH-Wertes der TRAP-Pufferlösung auf pH 5,0 mit HCl bzw. NaOH und Auffüllen der Lösung mit Aqua dest auf 1000 ml.
4. Pufferung der entparaffinierten Schnitte durch Einstellen in TRAP-Pufferlösung für 10 Minuten.
5. Herstellung der Färbelösung aus 40 mg Naphtol, 40 µl Dimethylformamid, 240mg Fast Red Violett LB Salt, 2 ml Triton X und 200 ml TRAP-Puffer.
6. Einstellen der entparaffinierten und gepufferten Schnitte in die TRAP-Färbelösung und Inkubation für 2 Stunden bei 37°C.
7. Nach zwei Stunden empfiehlt es sich das Färbeergebnis makroskopisch und mikroskopisch zu kontrollieren und bei ungenügender Färbung die Inkubationszeit zu verlängern. Bei der Kontrolle ist auf eine Feuchthaltung der Schnitte zu achten!

8. Kerngegenfärbung durch viermaliges kurzes Eintauchen der Schnitte in Meyer's Hämalan. Jeweils vor und nach der Färbung kurzes Spülen der Schnitte in Aqua dest. Anschließend Bläuung der gefärbten Präparate unter laufendem lauwarmem Leitungswasser für fünf Minuten.
9. Entwässerung der gefärbten Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80%, 96 %, 100 %, 100 %) für jeweils zwei Minuten, anschließend Einstellen der Präparate in zwei Xylolbäder für jeweils zwei Minuten.
10. Eindeckelung der Präparate mittels VitroClud®-Kleber und Deckgläsern. Die Präparate trocknen anschließend für mindestens 24 Stunden unter einem Abzug bei Raumtemperatur.
11. Lagerung der Präparate in einem vor direkter Lichteinstrahlung schützenden Objektträgerkasten bis zur weiteren Verwendung.

6.4.2 ASMA-Färbung (α -smooth muscle actin)

Ausrüstung und Reagenzien

- Xylol (Fa. J.T. Baker, Holland)
- Alkohole in unterschiedlichen Verdünnungen (100 %, 96 %, 80 %, 70 %, Fa. Herbeta, Deutschland)
- Aqua dest (Herstellung im Labor durch Milli-Q UF plus; Fa. Millipore, USA)
- Chroma-Phosphatpufferkonzentrat (Fa. Merck, Deutschland)
- Chromogenpuffer (als fertig hergestellte Lösung im Labor vorgehalten)
- Elite ABC-Kit PK 6200 (Fa. Vector, USA)
- AP Standard Kit AK 5000 (Fa. Vector, USA)
- AP Substrat SK 5100 Kit (Fa. Vector, USA)
- monoclonal mouse anti-human α -smooth-muscle-actin antibody, clone 1A4 (Primärantikörper)(Fa. DAKO, USA)
- DAKO-Diluent (Fa. DAKO, USA)
- Meyer's Hämalaun (Fa. Sigma)
- VitroClud[®]-Kleber (Einschlussmittel für mikroskopische Technik; Fa. R. Langenbrinck, Deutschland)
- feuchte Kammer
- Eppendorf-Pipetten verschiedener Volumina (Fa. Eppendorf, Deutschland)
- Fettstift (Fa. DAKO, USA)
- Reagenzgläser
- Vortex Schüttler VM3 (Fa. Assistent, Deutschland)
- Färbeküvetten
- Färbeschiffchen
- Objektträgerdeckel
- Paraffinschnitte

Methode

1. Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte durch Einstellen in zwei Xylolbäder für jeweils zehn Minuten, gefolgt von fünf Alkoholbädern in absteigender Reihe (100 %, 100 %, 96 %, 80 %, 70 %) für jeweils zwei Minuten und einem Bad von Aqua dest für 2 Minuten.
2. Herstellung des PBS-Spülpuffers aus einem Teil Phosphatpufferkonzentrat und neun Teilen Aqua dest (pH-Wert bei 7,2 bis 7,4).
3. Umfahren der Präparate mit dem Fettstift zur Verhinderung des Ablaufens der Färbeflüssigkeiten vom Objektträger.
4. Spülen der entparaffinierten und mit Fettstift umrandeten Präparate im PBS-Spülpuffer für zwei mal fünf Minuten mit Wechsel der Pufferlösung zwischen beiden Spülvorgängen.
5. Herstellung des Normalserums aus 5 ml Spülpuffer und 50 μ l anti-horse Normalserum Konzentrat (Elite ABC-Kit PK 6200; Verdünnung 1:100), anschließend gutes Mischen.
6. Aufbringen von jeweils 400 μ l Normalserum pro Objektträger und Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

7. Herstellung des primären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in benötigter Menge. Die Verdünnung erfolgt mit DAKO-Antibody Diluent.
8. Abkippen des Normalserum von den Objektträgern, Aufpipettieren von jeweils 400 µl Primärantikörper-Lösung pro Objektträger und Inkubation über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer. Anschließend Spülung in PBS-Puffer für zwei mal fünf Minuten mit Wechsel der Pufferlösung zwischen beiden Spülvorgängen.
9. Herstellung des biotinylierten Zweitantikörpers aus 5 ml Spülpuffer, 100 µl Normalserum Konzentrat und 100 µl biotinyliertem Zweitantikörper-Konzentrat (Elite ABC-Kit PK 6200), gutes Mischen.
10. Aufbringen von jeweils 400 µl biotinylierter Zweitantikörper-Lösung pro Objektträger und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Es empfiehlt sich während der Inkubation den ABC-Komplex anzusetzen, um die Raumtemperatur der Lösung zu garantieren.
11. Herstellung des ABC-Komplexes aus 5 ml Spülpuffer 50 µl Reagenz A und 50 µl Reagenz B (ABC-Standard Kit AK 5000), gutes Mischen.
12. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper Abkippen der Zweitantikörper-Lösung und Spülen mit Spülpuffer durch Aufpipettieren von 400 µl Spülpuffer je Objektträger. Es finden zwei Spülvorgänge für jeweils 5 Minuten mit Wechsel des Spülpuffers zwischen beiden Spülvorgang statt.
13. Nach Abschluss des Spülvorganges Abkippen des Spülpuffers und Aufpipettieren von 400 µl des zuvor hergestellten ABC-Komplexes (s. 11.) auf das Präparat. Inkubation der Präparate für 50 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.
14. Nach der Inkubation mit dem ABC-Komplex Abkippen der Lösung und Spülen mit Spülpuffer durch Aufpipettieren von 400 µl Spülpuffer je Objektträger. Es finden zwei Spülvorgänge für jeweils 5 Minuten mit Wechsel des Spülpuffers zwischen beiden Spülvorgang statt.
15. Nach Abschluss des Spülvorganges Abkippen des Spülpuffers und Aufpipettieren von 400 µl Chromogenpuffer je Objektträger zur Einstellung des pH-Wertes. Es finden zwei Inkubationsvorgänge für jeweils 5 Minuten mit Wechsel des Chromogenpuffers zwischen beiden Spülvorgang statt.
(Der Chromogenpuffer wird gleich zu Beginn der Arbeiten aus dem Kühlschrank entnommen und steht so bei Verwendung raumtemperiert zur Verfügung.)
16. Herstellung des AP-Substrates aus 5 ml Chromogenpuffer 50 µl Reagenz 1, 50 µl Reagenz 2 und 50 µl Reagenz 3. Nach Zugabe jeder Reagenz jeweils gutes Mischen der Lösung. Die Herstellung der Lösung erfolgt in einem mit Aluminiumfolie vor Licht geschützten Röhrchen, um ein Ausbleichen durch das Umgebungslicht zu verhindern.
17. Abkippen den Chromogenpuffers von den Objektträgern und Aufpipettieren des AP-Substrates. Die Entwicklung der Färbung erfolgt unter mikroskopischer Sichtkontrolle unter Anleitung durch eine erfahrene MTLA.
Aufgrund der individuellen Entwicklungsgeschwindigkeiten eines jeden Präpara-

tes erfolgt die Entwicklung für jedes Präparat einzeln, um eine Überfärbung zu vermeiden.

18. Das Stoppen der Reaktion erfolgt durch Abkippen der Lösung und Einstellen des Präparates in eine Küvette mit Spülpuffer.
19. Kerngegenfärbung durch viermaliges kurzes Eintauchen der Schnitte in Meyer's Hämalaun, vor sowie nach der Färbung jeweils kurzes Spülen der Schnitte in Aqua dest. Anschließend Bläuung der gefärbten Präparate unter laufendem Leitungswasser für fünf Minuten.
20. Entwässerung der gefärbten Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80%, 96 %, 100 %, 100 %) für jeweils zwei Minuten, anschließend Einstellen der Präparate in zwei Xylolbäder für jeweils zwei Minuten.
21. Eindeckelung der Präparate mittels VitroClud®-Kleber und Deckgläsern. Die Präparate trocknen anschließend für mindestens 24 Stunden unter einem Abzug bei Raumtemperatur.
22. Lagerung der Präparate in einem vor direkter Lichteinstrahlung schützenden Objektträgerkasten bis zur weiteren Verwendung.

6.5 Tabellen Einzelauswertung der Präparate

6.5.1 Bezugsflächen

Tabelle 7: Dargestellt sind die für die jeweiligen Wirbelsäulensegmente verwendeten Implantate, die Standzeit der zugehörigen Tiere, die Flächen der ROI insgesamt sowie die innerhalb der ROI enthaltenen Flächen von Knochen und Bindegewebe jeweils in mm². Jede Zeile stellt eine ausgewertete Sägescheibe dar, die Zugehörigkeit zu einem Wirbelsäulenabschnitt ist durch farbige Unterlegung dargestellt.

Code	Scheibe	Implantat	Standzeit (Wochen)	ROI Fläche (mm ²)	Knochen in ROI (mm ²)	BG in ROI (mm ²)
G1aS40	1	Ti-O ₂	6	46,610	21,291	10,674
	3	Ti-O ₂	6	41,400	16,538	7,870
G1bS40	1	Ti-O ₂	6	44,655	19,052	17,662
	3	Ti-O ₂	6	43,355	17,896	7,304
G1aS41	1	Ti-O ₂	6	51,986	17,121	17,855
	3	Ti-O ₂	6	41,137	14,891	12,332
G1bS41	4	Ti-O ₂	6	43,793	10,707	11,933
	6	Ti-O ₂	6	42,833	12,506	13,452
G1aS34	4	Ti-O ₂	6	57,731	23,911	7,795
	6	Ti-O ₂	6	43,477	19,488	10,816
G1bS34	1	Ti-O ₂	6	53,380	23,616	14,501
	3	Ti-O ₂	6	43,478	18,469	10,730
G1aS39	1	Ti-O ₂	6	52,504	20,207	15,980
	3	Ti-O ₂	6	51,862	18,324	14,929
G1bS39	1	Ti-O ₂	6	50,602	21,517	10,704
	2	Ti-O ₂	6	49,589	21,643	11,715
G1aS11	3	Ti-O ₂	6	20,891	10,242	2,155
	4	Ti-O ₂	6	32,041	13,587	6,624
	6	Ti-O ₂	6	29,923	12,805	8,865
G1bS11	3	Ti-O ₂	6	24,721	12,299	4,528
	4	Ti-O ₂	6	28,520	11,216	7,165
	6	Ti-O ₂	6	22,433	9,222	5,458
G2aS7	2	Ti-O ₂	12	55,656	26,266	12,641
	4	Ti-O ₂	12	33,355	9,784	13,643
G2bS7	5	Ti-O ₂	12	48,780	1,403	31,041
	7	Ti-O ₂	12	46,166	2,523	19,134
G2aS13	1	Ti-O ₂	12	49,982	11,753	15,672
	3	Ti-O ₂	12	34,637	9,235	11,246
G2aS29	3	Ti-O ₂	12	19,621	3,774	3,425
	4	Ti-O ₂	12	45,505	21,818	8,013
	6	Ti-O ₂	12	42,539	11,874	13,785
G2bS29	1	Ti-O ₂	12	48,358	26,983	9,523
	3	Ti-O ₂	12	27,628	9,177	11,529
G2aS37	3	Ti-O ₂	12	43,134	18,475	7,448
	5	Ti-O ₂	12	48,205	18,679	6,955
G2bS37	1	Ti-O ₂	12	42,472	16,463	16,629
	3	Ti-O ₂	12	48,372	22,764	13,104
	5	Ti-O ₂	12	24,622	8,302	9,527

Fortsetzung von Tabelle 7:

Code	Scheibe	Implantat	Standzeit (Wochen)	ROI Fläche (mm ²)	Knochen in ROI (mm ²)	BG in ROI (mm ²)
G2aS33	2	Ti-O ₂	12	42,515	7,033	27,628
	4	Ti-O ₂	12	40,315	8,039	25,025
G2bS33	1	Ti-O ₂	12	45,772	11,479	14,673
	3	Ti-O ₂	12	30,065	7,860	8,437
	6	Ti-O ₂	12	34,708	6,914	13,947
G2aS52	1	Ti-O ₂	12	34,866	14,523	4,461
	3	Ti-O ₂	12	13,578	1,860	4,715
	6	Ti-O ₂	12	28,807	7,733	6,199
G2bS52	3	Ti-O ₂	12	35,826	14,752	7,924
	4	Ti-O ₂	12	27,955	12,827	8,206
	5	Ti-O ₂	12	27,454	8,564	5,023
G3aS35	1	PS-Ti	6	43,618	10,871	5,473
	3	PS-Ti	6	29,579	9,751	5,562
G3bS35	5	PS-Ti	6	54,400	5,367	17,808
	7	PS-Ti	6	36,089	0,164	21,838
G3aS53	1	PS-Ti	6	30,215	11,871	8,829
	3	PS-Ti	6	32,111	10,739	5,079
G3bS53	2	PS-Ti	6	17,402	3,820	5,957
	5	PS-Ti	6	31,124	4,002	6,462
G3aS36	1	PS-Ti	6	57,693	20,320	12,501
	3	PS-Ti	6	38,227	13,350	5,410
G3bS36	1	PS-Ti	6	42,310	21,736	9,150
	3	PS-Ti	6	24,763	12,480	3,184
	6	PS-Ti	6	46,864	19,817	12,350
G3aS43	1	PS-Ti	6	40,064	20,724	5,652
	2	PS-Ti	6	44,089	25,262	9,133
G3bS43	4	PS-Ti	6	41,057	17,908	13,918
	6	PS-Ti	6	41,696	10,115	18,135
G3aS45	1	PS-Ti	6	54,077	18,517	20,224
	3	PS-Ti	6	50,280	12,882	20,336
	5	PS-Ti	6	23,239	1,678	11,331
G3bS45	1	PS-Ti	6	41,937	19,886	8,159
	3	PS-Ti	6	45,743	18,950	14,021
G4aS5	1	PS-Ti	12	40,744	8,347	19,646
	3	PS-Ti	12	21,179	1,714	14,609
	6	PS-Ti	12	45,066	7,959	25,561
G4bS5	2	PS-Ti	12	35,914	3,620	20,333
	8	PS-Ti	12	42,410	0,805	31,132
G4aS9	1	PS-Ti	12	44,431	6,731	18,227
	3	PS-Ti	12	30,443	4,071	11,422
G4bS9	4	PS-Ti	12	35,945	1,469	19,927
	6	PS-Ti	12	45,461	0,653	33,129

Fortsetzung von Tabelle 7

Code	Scheibe	Implantat	Standzeit (Wochen)	ROI Fläche (mm ²)	Knochen in ROI (mm ²)	BG in ROI (mm ²)
G4aS12	2	PS-Ti	12	53,588	20,152	20,229
	4	PS-Ti	12	29,423	11,265	12,884
	5	PS-Ti	12	37,822	12,087	7,409
G4aS28	2	PS-Ti	12	46,475	14,517	20,896
	4	PS-Ti	12	43,463	11,673	14,819
G4bS28	1	PS-Ti	12	47,737	10,149	26,777
	3	PS-Ti	12	33,234	8,078	16,487
G4aS38	7	PS-Ti	12	44,664	1,049	31,543
	9	PS-Ti	12	37,633	1,226	29,871
G4bS38	8	PS-Ti	12	41,863	1,563	9,532
	10	PS-Ti	12	56,995	0,000	27,010
G4aS44	2	PS-Ti	12	29,406	9,112	8,489
	4	PS-Ti	12	24,775	8,158	8,437
G4bS44	2	PS-Ti	12	29,841	9,593	9,474
	4	PS-Ti	12	13,490	3,302	3,422
	5	PS-Ti	12	26,503	4,531	8,473
G4aS47	1	PS-Ti	12	51,973	7,429	11,941
	3	PS-Ti	12	38,380	5,373	10,429
G4bS47	2	PS-Ti	12	37,122	2,270	15,667
	4	PS-Ti	12	40,517	2,026	17,320
	10	PS-Ti	12	18,951	1,206	12,438
G5aS27	2	APC	6	42,466	19,439	11,603
	4	APC	6	35,882	18,284	6,064
G5bS27	3	APC	6	33,135	15,960	5,332
	4	APC	6	45,170	23,355	5,761
	6	APC	6	32,654	8,712	9,316
G5aS31	2	APC	6	50,998	10,698	16,482
	4	APC	6	41,163	9,793	13,228
	5	APC	6	33,582	11,147	10,056
G5bS31	1	APC	6	49,064	21,019	7,958
	2	APC	6	47,103	19,750	9,812
G5aS32	3	APC	6	46,620	11,759	20,162
	4	APC	6	49,251	6,266	14,114
	6	APC	6	43,955	6,726	16,503
G5bS32	1	APC	6	43,294	20,365	7,207
	2	APC	6	37,377	19,861	6,018
	7	APC	6	29,646	6,891	6,226
G5aS50	1	APC	6	50,971	25,590	4,505
	3	APC	6	34,989	11,874	1,908
	6	APC	6	51,984	23,116	6,131
G5bS50	1	APC	6	60,966	23,203	12,282
	3	APC	6	43,189	16,626	3,263

Fortsetzung von Tabelle 7

Code	Scheibe	Implantat	Standzeit (Wochen)	ROI Fläche (mm ²)	Knochen in ROI (mm ²)	BG in ROI (mm ²)
G5aS51	1	APC	6	48,337	19,704	12,065
	3	APC	6	31,001	11,062	6,282
	6	APC	6	39,885	18,562	9,595
G5bS51	1	APC	6	52,353	23,106	9,082
	3	APC	6	28,469	10,634	4,801
	6	APC	6	43,177	21,417	5,848
G6aS25	4	APC	12	50,947	25,133	9,110
	6	APC	12	46,481	23,896	9,689
	8	APC	12	36,977	5,384	18,541
G6aS21	1	APC	12	51,157	16,502	9,181
	3	APC	12	41,368	14,430	6,934
G6aS26	4	APC	12	41,646	17,372	9,651
	6	APC	12	38,341	12,347	16,666
G6aS16	1	APC	12	39,402	12,085	9,026
	2	APC	12	54,516	21,396	8,831
	8	APC	12	24,124	7,032	4,814
G6aS23	1	APC	12	55,331	26,362	17,523
	3	APC	12	40,656	18,792	10,185
G6bS16	1	APC	12	41,178	13,093	4,953
	2	APC	12	58,203	16,742	11,963
G6bS23	1	APC	12	32,884	15,307	4,225
	2	APC	12	50,835	26,285	6,982
	8	APC	12	17,780	3,920	7,189
G6bS25	1	APC	12	49,320	21,507	10,385
	3	APC	12	36,416	15,365	8,164
G6bS21	4	APC	12	44,883	23,045	11,123
	6	APC	12	45,406	22,023	9,121
G6bS26	4	APC	12	46,478	26,023	9,204
	6	APC	12	44,919	13,887	22,639

6.5.2 Osteoklasten und Gefäße

Tabelle 8: Dargestellt sind die absoluten Zahlenwerte der Einzelauswertung sowie der Bezug der absoluten Zahlen auf die Bezugsflächen (siehe Tabelle 7). Jede Zeile stellt eine ausgewertete Sägescheibe dar, die Zugehörigkeit zu einem Wirbelsäulenabschnitt ist durch farbige Unterlegung dargestellt. Die Darstellung erfolgt getrennt für Osteoklasten und Gefäße.

Code	Scheibe	Osteoklasten		Gefäße	
		Anzahl Osteoklasten	OK/mm ² Knochen	Anzahl Gefäße	Gefäße/mm ² Bindegewebe
G1aS40	1	0	0	96	8,994
	3	2	0,121	128	16,265
G1bS40	1	0	0	61	3,454
	3	4	0,224	92	12,596
G1aS41	1	89	5,198	208	11,649
	3	10	0,672	239	19,381
G1bS41	4	39	3,642	203	17,011
	6	64	5,118	209	15,537
G1aS34	4	6	0,251	131	16,806
	6	53	2,720	117	10,818
G1bS34	1	4	0,169	134	9,241
	3	4	0,217	136	12,674
G1aS39	1	125	6,186	182	11,389
	3	22	1,201	207	13,865
G1bS39	1	6	0,279	139	12,986
	2	20	0,924	115	9,817
G1aS11	3	4	0,391	83	38,509
	4	0	0	70	10,567
	6	11	0,859	143	16,130
G1bS11	3	21	1,708	192	42,405
	4	15	1,337	52	7,258
	6	9	0,976	101	18,505
G2aS7	2	0	0	106	8,386
	4	0	0	185	13,560
G2aS13	1	2	0,170	110	7,019
	3	2	0,217	68	6,047
G2bS7	5	0	0	563	18,137
	7	0	0	270	14,111
G2aS29	3	1	0,265	68	19,852
	4	8	0,367	112	13,978
	6	20	1,684	96	6,964
G2bS29	1	11	0,408	58	6,091
	3	0	0	122	10,582
G2aS37	3	184	9,960	93	12,486
	5	31	1,660	93	13,372
G2bS37	1	61	3,705	53	3,187
	3	55	2,416	58	4,426
	5	14	1,686	108	11,336

Fortsetzung von Tabelle 8

		Osteoklasten		Gefäße	
Code	Scheibe	Anzahl Osteoklasten	OK/mm ² Knochen	Anzahl Gefäße	Gefäße/mm ² Bindegewebe
G2aS33	2	5	0,711	152	5,502
	4	10	1,244	260	10,390
G2bS33	1	0	0	180	12,267
	3	0	0	96	11,378
	6	3	0,434	158	11,329
G2aS52	1	55	3,787	172	38,557
	3	46	24,731	157	33,300
	6	235	30,391	215	34,682
G2bS52	3	78	5,287	194	24,484
	4	74	5,769	155	18,889
	5	155	18,098	138	27,476
G3aS35	1	2	0,184	113	20,648
	3	0	0	63	11,327
G3bS35	5	0	0	184	10,332
	7	2	12,200	176	8,059
G3aS36	1	9	0,443	149	11,919
	3	3	0,225	125	23,107
G3bS36	1	0	0	122	13,334
	3	0	0	107	33,603
	6	6	0,303	145	11,741
G3aS43	1	0	0	104	18,402
	2	1	0,040	105	11,497
G3bS43	4	0	0	109	7,832
	6	0	0	77	4,246
G3aS45	1	41	2,214	125	6,181
	3	163	12,654	169	8,310
	5	26	15,492	74	6,531
G3bS45	1	2	0,101	132	16,179
	3	19	1,003	48	3,424
G3aS53	1	0	0	136	15,403
	3	3	0,279	90	17,718
G3bS53	2	12	3,141	130	21,823
	5	51	12,743	121	18,724
G4aS5	1	0	0	130	6,617
	3	0	0	82	5,613
	6	0	0	201	7,863
G4bS5	2	8	2,210	279	13,721
	8	0	0	255	8,191

Fortsetzung von Tabelle 8

		Osteoklasten		Gefäße	
Code	Scheibe	Anzahl Osteoklasten	OK/mm ² Knochen	Anzahl Gefäße	Gefäße/mm ² Bindegewebe
G4aS9	1	0	0	118	6,474
	3	0	0	93	8,142
G4bS9	4	2	1,362	168	8,431
	6	0	0	198	5,977
G4aS12	2	0	0	198	9,788
	4	0	0	72	5,588
	5	0	0	111	14,983
G4aS28	2	36	2,480	119	5,695
	4	61	5,226	132	8,907
G4bS28	1	35	3,449	234	8,739
	3	24	2,971	297	18,014
G4aS38	7	10	9,529	131	4,153
	9	3	2,448	133	4,453
G4bS38	8	13	8,315	93	9,757
	10	0	0	236	8,737
G4aS44	2	4	0,439	269	31,689
	4	2	0,245	188	22,282
G4bS44	2	5	0,521	208	21,956
	4	0	0	175	51,141
	5	2	0,441	126	14,871
G4aS47	1	31	4,173	116	9,715
	3	4	0,744	119	11,410
G4bS47	2	13	5,727	264	16,851
	4	8	3,948	129	7,448
	10	5	4,144	63	5,065
G5aS27	2	2	0,103	63	5,430
	4	0	0	123	20,283
G5bS27	3	0	0	72	13,503
	4	14	0,599	132	22,912
	6	10	1,148	95	10,197
G5aS31	2	1	0,093	149	9,040
	4	0	0	136	10,281
	5	0	0	138	13,723
G5bS31	1	0	0	128	16,084
	2	0	0	130	13,250
G5aS32	3	117	9,950	136	6,745
	4	34	5,426	149	10,557
	6	15	2,230	112	6,787
G5bS32	1	0	0	42	5,828
	2	0	0	74	12,296
	7	63	9,142	46	7,388

Fortsetzung von Tabelle 8

		Osteoklasten		Gefäße	
Code	Scheibe	Anzahl Osteoklasten	OK/mm ² Knochen	Anzahl Gefäße	Gefäße/mm ² Bindegewebe
G5aS50	1	62	2,423	44	9,766
	3	1	0,084	51	26,730
	6	67	2,898	92	15,007
G5bS50	1	19	0,819	179	14,574
	3	5	0,301	76	23,293
G5aS51	1	1	0,051	142	11,769
	3	0	0	59	9,392
	6	18	0,970	98	10,214
G5bS51	1	0	0	154	16,956
	3	1	0,094	115	23,953
	6	2	0,093	99	16,930
G6aS25	4	15	0,597	114	12,513
	6	10	0,418	61	6,296
	8	27	5,015	235	12,675
G6bS25	1	0	0	90	8,666
	3	0	0	66	8,084
G6aS21	1	139	8,423	64	6,971
	3	18	1,247	85	12,259
G6bS21	4	0	0	81	7,282
	6	20	0,908	49	5,372
G6aS26	4	29	1,669	62	6,424
	6	0	0	138	8,280
G6bS26	4	4	0,154	123	13,363
	6	0	0	172	7,597
G6aS16	1	6	0,496	69	7,645
	2	3	0,140	134	15,173
	8	47	6,684	23	4,778
G6bS16	1	2	0,153	74	14,940
	2	5	0,299	158	13,207
G6aS23	1	23	0,872	227	12,955
	3	36	1,916	227	22,288
G6bS23	1	4	0,261	73	17,277
	2	16	0,609	105	15,039
	8	35	8,928	95	13,215

6.6 Kodierungslegende Statistikprogramm

Tabelle 9: Darstellung der Kodierung der Tiere, Implantate und Zeitpunkte in einfacher numerischer Form für das Statistikprogramm

Tiere		Implantate	
S40	1	Ti-O ₂	1
S41	2	PS-Ti	2
S34	3	APC	3
S39	4		
S11	5	Zeitpunkt	
S7	6	6 Wochen	1
S13	7	12 Wochen	2
S29	8		
S37	9	Segmente	
S33	10	Kranial	1
S52	11	Kaudal	2
S35	12		
S36	13		
S43	14		
S45	15		
S53	16		
S5	17		
S9	18		
S12	19		
S28	20		
S38	21		
S44	22		
S47	23		
S27	24		
S31	25		
S32	26		
S50	27		
S51	28		
S25	29		
S21	30		
S26	31		
S16	32		
S23	33		

7 Literaturverzeichnis

1. TNS Emnid, "CH-Alpha Bewegungsstudie 40+", 2005
2. Herberts P, Malchau H. Long-term registration has improved the quality of hip replacement. *Acta Orthop Scand* 2000; 71: 111-121
3. Bundesverband Medizintechnologie, Mitteilung an den Gemeinsamen Bundesausschuss, 2009
4. Kärrholm J, Garellick G, Rogmark C, Herberts P. Annual report of the Swedish hip-replacement register 2007
5. Mody DR, Esses SI, Heggeness MH. A histologic study of soft-tissue reactions to spinal implants. *Spine* 1994; 19: 1153-1156
6. Malchau H, Herberts P, Eisler T, Garellick G, Söderman P. The Swedish total hip replacement register. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A: 2-20
7. Johnsen SP, Sorensen HT, Lucht U, Soballe K, Overgaard S, Pedersen AB. Patient-related predictors of implant failure after primary total hip replacement in the initial, short- and long-terms. *J Bone Joint Surg Br* 2006; 88-B:1303-8
8. Furnes O, Lie SA, Espehaug B, Vollset SE, Engesaeter LB, Havelin LI. Hip disease and the prognosis of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83-B: 579-83
9. Woolson ST, Rahimtoola ZO. Risk factors for dislocation during the first 3 months after primary total hip replacement. *J Arthroplasty* 1999; 14: 662-8
10. Robertsson O, Dunbar M, Knutson K, Lewold S, Lidgren L. Validation of the Swedish knee arthroplasty register. *Acta Orthop Scand* 1999; 70: 467-72
11. Franklin J, Robertsson O, Gestsson J, Lohmander LS, Ingvarsson T. Revision and complication rates in 654 Exeter total hip replacements, with a maximum follow-up of 20 years. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2003; 4:6
12. Galante J, Jacobs J. Clinical performances of ingrowth surfaces. *Clin Orth Rel Res* 1992; 276: 41-49
13. Steinmann JC, Herkowitz HN. Pseudarthrosis of the spine. *Clin Orthop Rel Res* 1992; 284: 80-90
14. Capello WN, D'Antonio JA, Feinberg JR, Manley MT. Hydroxylapatite-coated total hip femoral components in patients less than fifty years old. Clinical and radiographic results after five to eight years of follow-up. *J Bone Joint Surg (Am)* 1997; 79: 1023-9
15. Konttinen YT, Zhao D, Beklen A et al. The microenvironment around total hip replacement prostheses. *Clin Orth Rel Res* 2005; 430: 28-38
16. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996; 17: 137-146
17. Hennig FF, Raithel HJ, Schaller KH, Döhler JR. Nickel-, chrome- and cobalt-concentrations in human tissue and body fluids of hip prosthesis patients. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1992; 6: 239-243
18. Steinemann S. Titanium - the material of choice? *Periodontology* 2000; 17: 7-21

19. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein syntheses of human osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 389-401
20. Morra M, Cassinelli C. Organic surface chemistry on titanium surfaces via thin film deposition. *J Biomed Mater Res* 1997; 37: 198-206
21. Bagno A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mat Science: Mat Med* 2004; 15: 936-949
22. Albrektsson T, Hansson HA. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surface. *Biomaterials* 1986; 7: 201-205
23. Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M. Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1996; 78: 647-51
24. Frauchiger VM, Schlottig F, Gasser B, Textor M. Anodic plasma-treatment of CP titanium surfaces for biomedical applications. *Biomaterials* 2004; 25: 593-606
25. Gristina AG. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin Orthop Rel Res* 1994; 298: 106-118
26. Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interfaces processes. *Adv Dent Res* 1999; 13: 8-20
27. Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W. Cellular and molecular biological events at the implant interface. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg* 1994; 22: 12-17
28. Chou L, Marek B, Wagner WR. Effects of hydroxylapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro. *Biomaterials* 1999; 20: 977-985
29. Engh CA, Bobyn JD, Glassmann AH. Porous-coated hip replacement. *J Bone Joint Surg* 1987; 69-B: 45-55
30. Thomas KA, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res* 1985; 19: 875-901
31. Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, Caputo A, Davies JE, Nishimura RD. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Impl Res* 2001; 12: 350-357
32. Inoue T, Cox JE, Pilliar RM, Melcher AH. Effect of the surface geometry of smooth and porous-coated titanium alloy on the orientation of fibroblasts in vitro. *J Biomed Mater Res* 1987; 21: 107-126
33. Geesink RG, de Groot K, Klein CP. Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg (Br)* 1988; 70: 17-22
34. Sun L, Berndt C, Gross K, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma sprayed hydroxylapatite coatings: A review. *J Biomed Mater Res* 2001; 58: 570-592
35. Brunski J. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Adv Dent Res* 1999; 13: 99-119
36. Gondolph-Zink B. Der Einfluss der Hydroxylapatitbeschichtung auf die Osteointegration belasteter und unbelasteter Implantate. *Orthopäde* 1998; 27: 96-104

37. Hallab NJ, Cunningham BW, Jacobs JJ. Spinal implant debris-induced osteolysis. *Spine* 2003; 28: 125-138
38. Kaar SG, Ragab AA, Kaye SJ et al. Rapid repair of titanium particle-induced osteolysis is dramatically reduced in aged mice. *J Orthop Res* 2001; 19: 171-8
39. Zou X, Li H, Teng X et al. Pedicle screw fixation enhances anterior lumbar interbody fusion with porous tantalum cages: An experimental study in pigs. *Spine* 2005; 30: 392-399
40. Dorr LD, Bloebaum R, Emmanuel J, Meldrum R. Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty. *Clin Orth Rel Res* 1990; 261: 82-95
41. Nalepka JL, Lee MJ, Kraay MJ et al. Lipopolysaccharide found in aseptic loosening of patients with inflammatory arthritis. *Clin Orthop Rel Res* 2006; 451: 229-235
42. Cunningham BW, Orbegoso CM, Dmitriev AE, Hallab NJ, Seftor JC, McAfee PC. The effect of titanium particulate on development and maintenance of a posterolateral spinal arthrodesis. *Spine* 2002; 27: 1971-81
43. Fornasier V, Wright J, Seligman J. The histomorphologic and morphometric study of asymptomatic hip arthroplasty. A postmortem study. *Clin Orthop Rel Res* 1991; 271: 272-82
44. Ren W, Wu B, Peng X, Hua J, Hao HN, Wooley PH. Implant wear induces inflammation, but not osteoclastic bone resorption, in RANKL -/- mouse. *J Orthop Res* 2006; 24: 1575-86
45. Goodman SB, Knoblich G, O'Connor M, Song Y, Sibley R. Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses. *J Biomed Mater Res* 1996; 31: 421-8
46. Jacobs JJ, Galante JO, Sumner DR. Local response to biomaterials: bone loss in cementless femoral stems. *Instr Course Lect* 1992; 14: 119-25
47. Ratner BD. The engineering of biomaterials exhibiting recognition and specificity. *J Mol Recognit* 1996; 9: 617-25
48. Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem* 1994; 56: 340-7
49. Könönen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 1325-41
50. Boyan BD, Sylvia VL, Liu Y et al. Surface roughness mediates its effects on osteoblasts via protein kinase A and phospholipase A2. *Biomaterials* 1999; 20: 2305-10
51. Saldana L, González-Carrasco JL, Rodríguez M, Munuera L, Vilaboa N. Osteoblast response to plasma-spray porous Ti6Al4V coating on substrates of identical alloy. *J Biomed Mater Res* 2006; 77A: 608-617
52. Dhert W, Klein C, Wolke J, van der Velde E, de Groot K, Rozing P. A mechanical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 1183-200
53. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 889-902

54. Rich A, Harris A. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. *J Cell Sci* 1981; 50: 1-7
55. Rothman RH, Hozack WJ, Ranawat A, Moriarty L. Hydroxylapatite-coated femoral stems. A matched-pair analysis of coated and uncoated implants. *J Bone Joint Surg (AM)* 1996; 78: 319-24
56. Nilsson KG, Cajander S, Kärrholm J. Early failure of hydroxylapatite-coating in total knee arthroplasty. A case report. *Acta Orthop Scand* 1994; 65: 212-4
57. Røynedsal AK, Ambjørnsen E, Støvne S, Haanaes HR. A comparative clinical study of three different endosseous implants in edentulous mandibles. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13: 500-5
58. Donnelly WJ, Kobayashi A, Freeman MA et al. Radiological and survival comparison of four methods of fixation of a proximal femoral stem. *J Bone Joint Surg (Br)* 1997; 79: 351-60
59. Magyar G, Toksvig-Larsen S, Moroni A. Hydroxylapatite coating of threaded pins enhances fixation. *J Bone Joint Surg (Br)* 1997; 79: 487-9
60. Baxter LC, Frauchiger V, Textor M, ap Gwynn I, Richards RG. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *Europ Cells Mat* 2002; 4: 1-17
61. Geesink GT, de Groot K, Klein C. Chemical implant fixation using hydroxylapatite coatings. *Clin Orthop Rel Res* 1987; 225: 147-170
62. Moroni A, Gaja VL, Maltarello MC, Savarino et al. Biomechanical, scanning electron microscopy, and microhardness analyses of the bone-pin interface in hydroxylapatite coated versus uncoated pins. *J Orthop Trauma* 1997; 11: 154-61
63. Collier JP, Surprenant VA, Mayor MB, Wrona M, Jensen RE, Surprenant HP. Loss of hydroxylapatite coating in retrieved, total hip components. *J Arthroplasty* 1993; 8: 389-93
64. Partale K, Klein P, Schell H et al. Poly (d,l-lactide) coating is capable of enhancing osseous integration of Schanz screws in the absence of infection. *J Appl Biomater* 2005; 74B: 608-616
65. Raschke MJ, Schmidmaier G. Biologisierung von Implantaten in der Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates. *Unfallchirurg* 2004; 107: 653-663
66. Ferris DM, Moodie GD, Dimond PM, Gioranni CW, Ehrlich MG, Valentini RF. RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials* 1999; 20: 2323-31
67. Rezania A, Healy KE. The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells. *J Biomed Mater Res* 2000; 52: 595-600.
68. Marchesi DG. Spinal fusion: bone and bone-substitutes. *Eur Spine J* 2000; 9: 372-378
69. Endo K. Chemical modification of metallic implant surfaces with biofunctional proteins (Part 1). Molecular structure and biological activity of a modified NiTi alloy surface. *Dent Mater J* 1995; 40: 324-335
70. Ferguson SJ, Langhoff JD, Voelter K et al. Biomechanical comparison of different surface modifications for dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; 23: 1037-46

71. Chang YL, Stanford CM, Keller JC. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: Implications for hydroxylapatite (HA)-enhanced bone formation. *J Biomed Mater Res* 2000; 52: 270-278
72. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthesis. *Clin Orth Rel Res* 1981; 157: 259-278
73. Ducheyne P, Radin S, King L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 25-34
74. Paschalis EP, Zhao Q, Tucker BE et al. Degradation potential of plasma-sprayed hydroxylapatite-coated titanium implants. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 1499-505
75. Kato T, Nakamura S, Katayama K, Yamashita K. Electric polarization of plasma-spray-hydroxylapatite coatings for improvement of osteoconduction of implants. *J Biomed Mater Res* 2005; 74A: 652-658
76. Piattelli A, Scarano A, Corigliano M, Piattelli M. Effects of alkaline phosphatase on bone healing around plasma-sprayed titanium implants: a pilot study in rabbits. *Biomaterials* 1996; 17: 1443-49
77. Schreckenbach JP, Marx G, Schlottig F, Textor M, Spencer ND. Characterization of anodic spark converted titanium surfaces for biomedical applications. *J Mat Science: Mat Med* 1999; 10: 453-457
78. Neuhoﬀ D, Thompson RE, Frauchinger VM et al. Anodic plasma treatment of titanium Schanz screws reduces pin loosening. *J Orthop Trauma* 2005; 19: 543-550
79. Schlegel P, Hayes JS, Frauchiger VM et al. An in vivo evaluation of the biocompatibility of anodic plasma chemical (APC) treatment of titanium with calcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009 Jul; 90: 26-34
80. Schlegel P. In-vivo biocompatibility study of different calcium-phosphate surfaces for implant bone integration. Dissertation 2004
81. Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD. Annulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model. *Spine* 1990; 18: 762-7
82. Kandziora F, Pflugmacher R, Scholz M, Schnake K, Lucke M, Schröder R, Mittelmeier T. Comparison between sheep and human cervical spines: an anatomic, radiographic, bone mineral density, and biomechanical study. *Spine* 2001; 26: 1028-37
83. Wilke HJ, Kettler A, Wenger H, Claes LE. Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine. *Anat Rec* 1997; 247: 542-555
84. Moore RJ, Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD. Changes in endplate vascularity after an outer annulus tear in the sheep. *Spine* 1992; 17: 874-8
85. Gunzburg R, Fraser RD, Moore R, Vernon-Roberts B. An experimental study comparing percutaneous discectomy with chemonucleolysis. *Spine* 1993; 18: 218-26
86. Ahlgren BD, Vasavada A, Brower RS, Lydon C, Herkowitz HN, Panjabi MM. Annular incision technique on the strength and multidirectional flexibility of the healing intervertebral disc. *Spine* 1994; 19: 948-54

87. Greenfield EM, Bi Y, Ragab AA, Goldberg VM, van de Motter RR. The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening. *J Orthop Res* 2002; 20: 1-8
88. Hamamoto N, Hamamoto Y, Nakajima T, Ozawa H. Histological, immunohistochemical and ultrastructural study on the effects of surface charge on bone formation in the rabbit mandible. *Archs Oral Biol* 1995; 40: 97-106
89. Baramki H, Papin P., Steffen T. A surgical approach to the ventral aspect of the lumbar vertebrae in the sheep model. *Surg Radiol Anat* 2000; 22: 25-7
90. Tay B, Berven S. Indications, techniques, and complications of lumbar interbody fusion. *Sem Neurol* 2002; 22: 221-230
91. Schreiner U, Scheller G, Schwarz M. Die zervikale interkorporelle Fusion mit einem neuen, verschraubbaren Titanspacer. Eine kontrollierte, tierexperimentelle Studie. *Z Orthop Unfall* 2007; 145: 736-743
92. Linder L. High-resolution microscopy of the implant-tissue interface. *Acta Orthop Scand* 1985; 56: 269-272
93. Zou X, Xue Q, Li H, Büniger M, Lind M, Büniger C. Effect of alendronate on bone ingrowth into porous tantalum and carbon fiber interbody devices. *Acta Orthop Scand* 2003; 74: 596-603
94. Hayman A. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 2008; 41: 218-23
95. Skalli O, Pelte M, Peclet M et al. α -smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 315-21

8 Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. F. Kandziora für die Überlassung des Promotionsthemas sowie Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. N. Haas für die Möglichkeit der Promotion in der von ihm geleiteten Klinik.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. ing. G. Duda für die Möglichkeit der Arbeit im von ihm geleiteten Julius-Wolff-Institut des Centrums für Muskuloskelettale Chirurgie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum.

Ich danke Herrn Dr. med. P. Schleicher als Studienleiter sowie Fr. dipl. math. Ch. Gehricke für die gute und engagierte Beratung bei der statistischen Aufarbeitung der Studiendaten.

Weiterhin danke ich Frau Approb. med. vet. P. Endres und Herrn Approb. med. vet. H. Strahtmann für die Unterweisung im Umgang mit den Versuchstieren und den Arbeitsabläufen, sowie die freundliche Atmosphäre und hilfsbereite Zusammenarbeit während der klinischen und experimentellen Phase der Arbeit.

Dank für die Hilfestellung bei der Präparation der Untersuchungsmaterialien und die Unterweisung in den Techniken und Abläufen des Labors richte ich an Frau G. Hardung, Frau G. Korus, Herrn M. Wolny, Frau C. Bergmann und Herrn M. Thiele.

Für die Durchsicht und die Hilfestellung bei der Erstellung und Vervollkommnung der formalen und logischen Richtigkeit der Arbeit danke ich allen Korrekturlesern. Besonderen Dank richte ich an Frau Dr. rer. nat. S. Unewehr und Herrn Dr. rer. nat. V. Kodelja.

Schließlich, aber ausdrücklich nicht zuletzt, danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern und meinem Bruder für die Möglichkeit und Unterstützung meines Studiums und den unaufhörlichen Beistand in allen Lebenslagen.

Danke!

Berlin, im Juni 10

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Lars- Olav Harnisch

Erklärung

„Ich, Lars-Olav Harnisch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Evaluation der lumbalen Spondylodese mittels APC-behandelter Titanimplantate“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 24. Juni 2010